**Este texto es exclusivamente un instrumento de documentación y no surte efecto jurídico. Las instituciones de la UE no asumen responsabilidad alguna por su contenido. Las versiones auténticas de los actos pertinentes, incluidos sus preámbulos, son las publicadas en el Diario Oficial de la Unión Europea, que pueden consultarse a través de EUR-Lex. Los textos oficiales son accesibles directamente mediante los enlaces integrados en este documento**

►**B**

# REGLAMENTO (CE) Nº 440/2008 DE LA COMISIÓN

## de 30 de mayo de 2008

## por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)

**(Texto pertinente a efectos del EEE)**

(DO L 142 de 31.5.2008, p. 1)

Modificado por:

| | | Diario Oficial | | |
|---|---|---|---|---|
| | | nº | página | fecha |
| ►**M1** | Reglamento (CE) nº 761/2009 de la Comisión de 23 de julio de 2009 | L 220 | 1 | 24.8.2009 |
| ►**M2** | Reglamento (UE) nº 1152/2010 de la Comisión de 8 de diciembre de 2010 | L 324 | 13 | 9.12.2010 |
| ►**M3** | Reglamento (UE) nº 640/2012 de la Comisión de 6 de julio de 2012 | L 193 | 1 | 20.7.2012 |
| ►**M4** | Reglamento (UE) nº 260/2014 de la Comisión de 24 de enero de 2014 | L 81 | 1 | 19.3.2014 |
| ►**M5** | Reglamento (UE) nº 900/2014 de la Comisión de 15 de julio de 2014 | L 247 | 1 | 21.8.2014 |
| ►**M6** | Reglamento (UE) 2016/266 de la Comisión de 7 de diciembre de 2015 | L 54 | 1 | 1.3.2016 |
| ►**M7** | Reglamento (UE) 2017/735 de la Comisión de 14 de febrero de 2017 | L 112 | 1 | 28.4.2017 |
| ►**M8** | Reglamento (UE) 2019/1390 de la Comisión de 31 de julio de 2019 | L 247 | 1 | 26.9.2019 |

Rectificado por:

►**C1** Rectificación, DO L 314 de 14.11.2012, p. 47 (640/2012)

▼B

# REGLAMENTO (CE) Nº 440/2008 DE LA COMISIÓN

**de 30 de mayo de 2008**

**por el que se establecen métodos de ensayo de acuerdo con el Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH)**

**(Texto pertinente a efectos del EEE)**

*Artículo 1*

Los métodos de ensayo que deben aplicarse a efectos del Reglamento (CE) nº 1907/2006 se recogen en el anexo del presente Reglamento.

*Artículo 2*

La Comisión revisará, cuando proceda, los métodos de ensayo incluidos en el presente Reglamento con el fin de sustituir, reducir o perfeccionar los ensayos con animales vertebrados.

*Artículo 3*

Todas las referencias al anexo V de la Directiva 67/548/CEE se entenderán hechas al presente Reglamento.

*Artículo 4*

El presente Reglamento entrará en vigor el día siguiente al de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 1 de junio de 2008.

▼B

*ANEXO*

▼M6

*Nota:*

Antes de utilizar cualquiera de los siguientes métodos de ensayo con una sustancia de componentes múltiples (MCS), con una sustancia de composición desconocida o variable, producto complejo de reacción o material biológico (UVCB), o con una mezcla, y en caso de que en el respectivo método de ensayo no se indique la aplicabilidad del mismo para estas MCS, UVCB o mezclas, deberá sopesarse si el método es adecuado para alcanzar el objetivo reglamentario previsto.

Si el método se utiliza para ensayar una MCS, UVCB o una mezcla, debe disponerse de información suficiente sobre su composición, en la medida de lo posible, como, por ejemplo, mediante la identidad química de sus componentes, las cantidades en que están presentes, y las propiedades pertinentes de los componentes.

## ▼BPARTE A: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

ÍNDICE


A.1. PUNTO DE FUSIÓN/CONGELACIÓN

A.2. PUNTO DE EBULLICIÓN

A3. DENSIDAD RELATIVA

A.4. PRESIÓN DE VAPOR

A.5. TENSIÓN SUPERFICIAL

A.6. HIDROSOLUBILIDAD

A.8. COEFICIENTE DE REPARTO

A.9. PUNTO DE INFLAMACIÓN

A.10. INFLAMABILIDAD (SÓLIDOS)

A.11. INFLAMABILIDAD (GASES)

A.12. INFLAMABILIDAD (EN CONTACTO CON EL AGUA)

A.13. PROPIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS Y LÍQUIDOS

A.14. PROPIEDADES EXPLOSIVAS

A.15. TEMPERATURA DE AUTOINFLAMACIÓN (LÍQUIDOS Y GASES)

A.16. TEMPERATURA RELATIVA DE AUTOINFLAMACIÓN DE SÓLIDOS

A.17. PROPIEDADES COMBURANTES (SÓLIDOS)

A.18. PESO MOLECULAR MEDIO EN NÚMERO Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE LOS POLÍMEROS

A.19. CONTENIDO DE SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN LOS POLÍMEROS

A.20. COMPORTAMIENTO DE DISOLUCIÓN/EXTRACCIÓN

A.21. PROPIEDADES COMBURENTES (LÍQUIDOS)

A.22. DIÁMETRO MEDIO GEOMÉTRICO DE LAS FIBRAS PONDERADO POR LA LONGITUD

A.23. COEFICIENTE DE REPARTO (1-OCTANOL/AGUA): MÉTODO DE AGITACIÓN LENTA

A.24. COEFICIENTE DE REPARTO (N-OCTANOL/AGUA), MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

A.25. CONSTANTES DE DISOCIACIÓN EN AGUA (MÉTODO DE VALORACIÓN VOLUMÉTRICA — MÉTODO DE ESPECTROFOTOMETRÍA — MÉTODO DE CONDUCTIMETRÍA)

▼B

## A.1. PUNTO DE FUSIÓN/CONGELACIÓN

### 1. MÉTODO

La mayoría de los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en las referencias (2) y {3).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos y los aparatos descritos a continuación se utilizan para determinar el punto de fusión de los productos químicos, cualquiera que sea su grado de pureza.

La selección del método dependerá de la naturaleza de la sustancia problema. En consecuencia, el factor limitante dependerá de que la sustancia sea fácil, difícilmente o no pulverizable.

En determinadas sustancias será preferible determinar el punto de congelación o de solidificación; las normas para proceder a dichas determinaciones también se recogen en el presente método.

Cuando, debido a propiedades especiales de la sustancia, no pueda medirse convenientemente ninguno de los parámetros mencionados, puede ser adecuado medir el punto de fluidez.

### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El punto de fusión se define como la temperatura a la que se produce la transición de fase del estado sólido al líquido a presión atmosférica normal; esta temperatura corresponde idealmente a la temperatura de congelación.

Dado que la transición de fase de numerosas sustancias se extiende en una amplia gama de temperaturas, esta se designa muchas veces con el nombre de intervalo de fusión.

Conversión de las unidades (K a $^{o}$C).

$t = T - 273{,}15$

t = temperatura Celsius, grado Celsius ($^{o}$C)

T = temperatura termodinámica, kelvin (K)

### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Deberán servir, esencialmente, para comprobar el funcionamiento del método de vez en cuando y para comparar con los resultados obtenidos mediante otros métodos.

En la referencia (4) se enumeran determinadas sustancias de calibración.

▼B

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se determina la temperatura {o intervalo de temperatura) de transición de fase del estado sólido al liquido o viceversa. En la práctica, las temperaturas del inicio y del final del proceso de fusión/congelación se determinan al calentar/enfriar una muestra de la sustancia problema a presión atmosférica. Se describen cinco tipos de métodos: el método de tubo capilar, el método de superficie caliente, determinación de la temperatura de congelación, métodos de análisis térmico y determinación del punto de fluidez (como el método elaborado para derivados del petróleo).

En algunos casos puede ser conveniente medir la temperatura de congelación en lugar de la temperatura de fusión.

1.4.1. **Método de tubo capilar**

1.4.1.1. *Dispositivos de temperatura de fusión con baño líquido*

Introducir en un tubo capilar una pequeña cantidad de sustancia finamente pulverizada y comprimirla firmemente. Calentar dicho tubo al mismo tiempo que un termómetro y ajustar el aumento de temperatura a poco menos de 1 K por minuto, durante la fusión real. Tomar nota de las temperaturas correspondientes al comienzo y al final de la fusión.

1.4.1.2. *Dispositivos de temperatura de fusión con bloque metálico*

El fundamento es el mismo que el descrito en el punto 1.4.1.1, con la diferencia de que el tubo capilar y el termómetro están colocados en un bloque de metal calentado y se observan a través de aberturas practicadas en este último.

1.4.1.3. *Detección fotoeléctrica*

Calentar automáticamente en un cilindro metálico la muestra contenida en el tubo capilar. Por una abertura practicada en el cilindro, enviar un rayo de luz a través de la sustancia hacia una célula fotoeléctrica cuidadosamente calibrada. En el momento de la fusión, las propiedades ópticas de la mayor parte de las sustancias se modifican en el sentido de que la opacidad da paso a la transparencia. En consecuencia, la intensidad de la luz que llega a la célula fotoeléctrica aumenta y envía una señal de parada al indicador digital que registra la temperatura del termómetro de resistencia de platino colocado en la cámara de calentamiento. Este método no es aplicable a determinadas sustancias muy coloreadas.

1.4.2. **Método de superficie caliente**

1.4.2.1. *Método de la placa caliente de Kofler*

La placa caliente de Kofler se compone de dos piezas de metal de conductividad térmica diferente, que se calientan eléctricamente. Está hecha de manera que el gradiente de temperatura sea casi lineal en toda su longitud. La temperatura de dicha placa puede variar de 283 a 573 K gracias a un dispositivo especial de lectura de la temperatura que tiene un cursor con un índice y una regleta graduada, especialmente concebido para dicha placa. Para determinar un punto de fusión se deposita una fina capa de sustancia directamente sobre la placa caliente. En unos segundos, se forma una fina línea de división entre la fase fluida y la fase sólida. Leer la temperatura a la altura de dicha línea, colocando el índice frente a esta última.

▼B

1.4.2.2. *Microscopio de fusión*

Se utilizan diferentes microscopios de platina caliente para determinar puntos de fusión con cantidades de sustancia muy pequeñas. La temperatura se suele medir con un termopar sensible, pero a veces se usa un termómetro de mercurio. El dispositivo tipo tiene una carcasa de calor que contiene una platina de metal en la que se coloca una lámina de vidrio sobre la que se deposita la muestra. El centro de la platina metálica se atraviesa con un agujero que permite el paso de la luz procedente del espejo de iluminación del microscopio. Al utilizarlo, la carcasa se cierra con una placa de vidrio para impedir la entrada de aire a la zona de la

El calentamiento de la muestra se regula con un reostato. Para realizar mediciones muy precisas se puede utilizar luz polarizada en el análisis de las sustancias ópticamente anisótropas.

1.4.2.3. *Método de menisco*

Este método se aplica específicamente a las poliamidas.

Se determina la temperatura a la cual se observa, a simple vista, el desplazamiento de un menisco de aceite de silicona, atrapado entre una superficie caliente y un cubreobjetos colocado encima de la muestra de poliamida.

1.4.3. **Método de determinación del punto de congelación**

Introducir la muestra en un tubo de ensayo especial y colocarlo en un aparato que permita la determinación del punto de congelación. Agitar suavemente la muestra sin interrupción durante el enfriamiento, observando al mismo tiempo la temperatura y registrándola a intervalos adecuados. Cuando varias lecturas indiquen una temperatura constante (previa corrección termométrica), se considera el valor de esta temperatura como el punto de congelación.

Debe evitarse el sobreenfriamiento manteniendo el equilibrio entre las fases sólida y líquida.

1.4.4. **Análisis térmico**

1.4.4.1. *Análisis térmico diferencial (ATD)*

Esta técnica registra la diferencia de temperaturas entre ¡a sustancia y un material de referencia en función de la temperatura, cuando ¡a sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Cuando la muestra sufre una transición que suponga un cambio de entalpia, ese cambio se indicará por una desviación endotérmica (fusión) o exotérmica (congelación) de la línea de base del registro de temperatura.

▼B

1.4.4.2. *Calorimetría diferencial de barrido (CDB)*

Esta técnica registra la diferencia de apone energético a una sustancia y a un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Esta energía es la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura nula entre la sustancia y el material de referencia. Cuando la muestra sufre una transición que suponga un cambio de entalpia, ese cambio se indicará por una desviación endotérmica (fusión) o exotérmica (congelación) de la línea de base del registro del flujo de calor.

1.4.5. **Punto de fluidez**

Este método, desarrollado para los derivados del petróleo, es adecuado para utilizarse con sustancias oleosas de baja temperatura de fusión.

Tras un calentamiento previo, se va enfriando la muestra a una velocidad específica y se examinan sus características Teológicas a intervalos de 3 K. Se registra como punto de fluidez la temperatura mínima a la que se aprecia movimiento de la sustancia.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

En el cuadro siguiente se indican las condiciones de aplicación y la precisión de los diferentes métodos de determinación del punto de fusión/intervalo de fusión.

CUADRO: APLICABILIDAD DE LOS MÉTODOS

A. **Método de tubo capilar**

| Método de medidas | Sustancias pulverizablesSí | Sustancias dificilmente pulverizables | Gama de temperatura | Precisión estimada ([1]) | Norma existente |
|---|---|---|---|---|---|
| Dispositivo de temperatura de fusión con baño liquido | Sí | Solo algunas | De 273 a 573 K | ± 0,3 K | JIS K 0064 |
| Dispositivo de temperatura de fusión con un bloque metálico | Sí | Solo algunas | De 293 a > 573 K | ± 0,5 K | ISO 1218(E) |
| Detección fotoeléctrica | Sí | Varias con dispositivos de aplicación | De 253 a 573 K | ± 0,5 K | |

([1]) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

▼B

B. **Métodos de superficie caliente y de congelación**

| Método de medidas | Sustancias pulverizables | Sustancias difícilmente pulverizables | Gama de temperatura | Precisión estimada (1) | Norma existente |
|---|---|---|---|---|---|
| Placa caliente Kofler | Sí | No | De 283 a > 573K | ± 1,0 K | ANSI/ASTM D 345176 |
| Microscopio de fusion | Sí | Solo algunas | De 273 a > 573K | ± 0,5 K | DIN 53736 |
| Método de menisco | No | Específico de las poliamidas | De 293 a > 573K | ± 0,5 K | ISO 1218 (E) |
| Métodos de punto de congelación | Sí | Sí | De 223 a 573 K | ± 0,5 K | por ejemplo BS 4695 |

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

C. **Análisis térmico**

| Método de medidas | Sustancias pulverizables | Sustancias difícilmente pulverizables | Gama de temperatura | Precisión estimada (1) | Norma existence |
|---|---|---|---|---|---|
| Análisis térmico diferenctal | Sí | Sí | De 173 a 1 273 K | hasta 600 K ± 0,5 K hasta 1 273 K ± 2,0 K | ASTME 53776 |
| Calorimetría diferencial de barrido | Sí | Sí | De 173 a 1 273 K | hasta 600 K ± 0,5 K hasta 1 273 K ± 2,0 K | ASTME 53776 |

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado depureza de las sustancias.

D. **Punto de fluidez**

| Método de medidas | Sustancias pulverizables | Sustancias difícilmente pulverizables | Gama de temperatura | Precisión estimada (1) | Norma existente |
|---|---|---|---|---|---|
| Punto de fluidez | Para derivados del petróleo y sustancias oleosas | Para derivados del petróleo y sustancias oleosas | Pe 223 a 323 K | ± 3,0 K | ASTM D 9766 |

(1) Valor dependiente del tipo de instrumento y del grado de pureza de las sustancias.

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

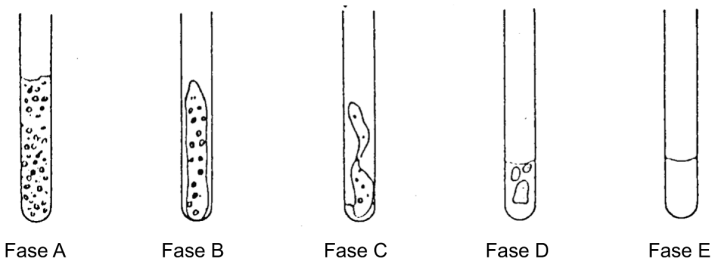
Los procedimientos de casi todos los métodos de ensayo están descritos en normas internacionales y nacionales (véase el apéndice 1).

1.6.1. **Métodos de tubo capilar**

Cuando la elevación de temperatura es lenta, las sustancias finamente pulverizadas pasarán, normalmente, por las fases de fusión representadas en la figura 1:

▼B

*Figura 1*




Fase A = (Comienzo de la fusión): se adhieren uniformemente gotas finas a la pared interior del tubo capilar.

Fase B = Aparece un espacio libre entre la muestra y la pared interior, en razón de la retracción del producto en fusión.

Fase C = La muestra, retraída, comienza a hundirse y a licuarse.

Fase D = Se forma un menisco completo en la superficie, pero queda todavía una cantidad apreciable de partículas sólidas.

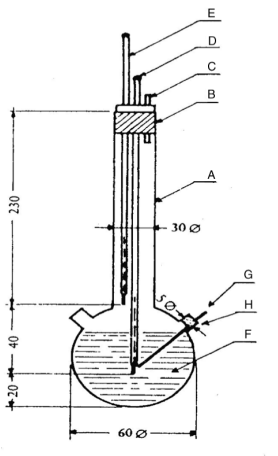
Fase E = (Final de la fusión): no hay ya ninguna partícula sólida.

Durante la determinación del punto de fusión, conviene anotar la temperatura al comienzo y al final de la fusión.

1.6.1.1. *Dispositivos con baña líquido*

La figura 2 representa un tipo de aparato estandarizado de vidrio (JIS K 0064). Todas las dimensiones están expresadas en milímetros.

*Figura 2*




A = Matraz de medida
B = Tapón
C = Tubo de ventilación
D = Termómetro
E = Termómetro auxiliar
F = Baño líquido
G = Tubo capilar de vidrio (80 a 100 mm de longitud; 1,0 mm ± 0,2 mm de diámetro interior y 0,2 a 0,3 mm de espesor de la pared)
H = Tubo lateral

▼B

*Baño líquido*

El líquido deberá elegirse en función del punto de fusión que deba determinarse; por ejemplo, se utilizará parafina líquida para los puntos de fusión que no pasen de 473 K, aceite de silicona para los puntos de fusión que no pasen de 573 K.

Podrá utilizarse una mezcla de tres partes de ácido sulfúrico y dos partes de sulfato de potasio (en peso) para los puntos de fusión superiores a 523 K. Deben adoptarse precauciones adecuadas cuando se utilice este tipo de mezcla.

*Termómetro*

Solo podrán utilizarse termómetros que cumplan las exigencias de las normas siguientes o de sus equivalentes:

ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001.

*Procedimiento*

Pulverizar finamente la sustancia seca en un mortero e introducirla en un tubo capilar cerrado en un extremo. La altura del contenido será de unos 3 mm después de haberlo comprimido bien. Para obtener una muestra uniformemente comprimida, hay que dejar caer el tubo capilar desde una altura de unos 700 mm por el interior de un tubo de vidrio colocado verticalmente sobre un vidrio de reloj.

Colocar el tubo capilar, así llenado, en el baño de tal manera que la parte central del bulbo de mercurio del termómetro esté en contacto con la parte del capilar que contiene la muestra. En general, el tubo capilar se introduce en el aparato en el momento en que el baño está a unos 10 K por debajo del punto de fusión.

Regular el calentamiento del baño de manera que el aumento de la temperatura sea de unos 3 K/minuto. Agitar el líquido. Al llegar a unos 10 K por debajo de la temperatura de fusión esperada, regular el aumento de temperatura a un máximo de 1 K/minuto.

*Cálculo*

El cálculo del punto de fusión se efectúa mediante la fórmula siguiente;

$$T = T_D + 0{,}00016(T_D - T_E)\ n$$

donde

$T$ = temperatura de fusión corregida, expresada en K

$T_D$ = temperatura leída en el termómetro D, expresada en K

$T_E$ = temperatura leída en el termómetro E, expresada en K

$n$ = número de graduaciones de la columna de mercurio del termómetro D en el vástago emergente.

1.6.1.2. *Dispositiva con bloque metálico*

*Aparato:*

*El aparato consta de:*

— un bloque metálico cilíndrico cuya parte superior está vacía y forma un recinto de calentamiento (véase la figura 3),

— un tapón metálico atravesado por dos o más agujeros que permitan la introducción de los tubos en el bloque,

▼B

— un sistema de calentamiento del bloque metálico; por ejemplo, una resistencia eléctrica incorporada al bloque,

— un reostato para regular la potencia, si se utiliza calentamiento eléctrico,

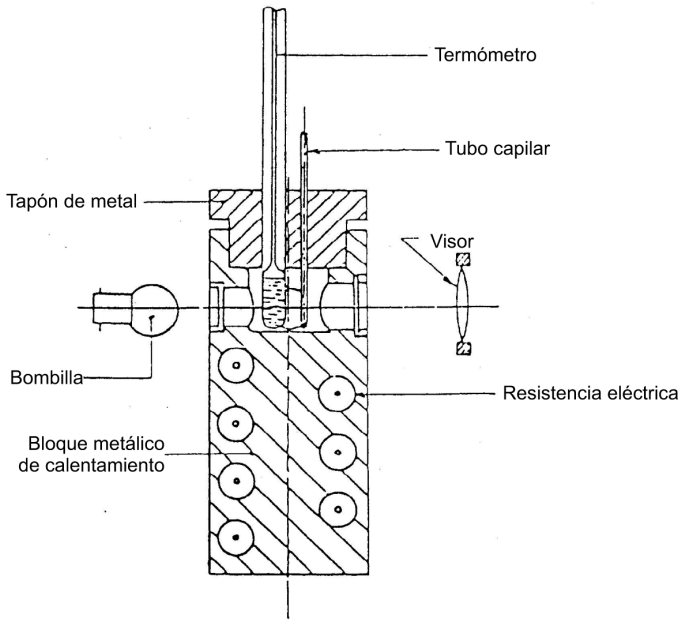
— cuatro ventanas de vidrio resistente al calor, diametralmente opuestas, en ángulo recto, en las paredes laterales del recinto. Frente a una de dichas ventanas se instalará un visor para observar el tubo capilar. Las otras tres ventanas permitirán iluminar el interior del recinto mediante bombillas,

— un tubo capilar, de vidrio resistente al calor, cerrado en un extremo (véase el punto 1.6.1.1).

*Termómetro*

Véanse las normas citadas en el punto 1.6.1.1. También podrán utilizarse elementos termoeléctricos de una precisión equivalente.

*Figura 3*




1.6.1.3. *Detección fotoeléctrica*

*Aparato y procedimiento:*

El aparato consiste en un recinto metálico dotado de un sistema de calentamiento automático. Se llenan tres tubos capilares siguiendo las instrucciones del punto 1.6.1.1 y se colocan en el horno.

▼B

Se pueden hacer varios aumentos lineales de temperatura para calibrar el aparato. El aumento de temperatura apropiado se regula eléctricamente con una velocidad constante y lineal preseleccionada. Los aparatos registradores indican la temperatura real del horno y la temperatura de la sustancia en los tubos capilares.

1.6.2. **Métodos de superficie caliente**

1.6.2.1. *Placa caliente Kofler*

Véase el apéndice.

1.6.2.2. *Microscopio de fusión*

Véase el apéndice.

1.6.2.3. *Método de menisco (poliamidas)*

Véase el apéndice.

El aumento de temperatura en la zona del punto de fusión deberá ser inferior a 1 K/min,

1.6.3. **Métodos de determinación del punto de congelación**

Véase el apéndice.

1.6.4. **Análisis térmico**

1.6.4.1. *Análisis térmico diferencial*

Véase el apéndice.

1.6.4.2. *Calorimetría diferencial de barrido*

Véase el apéndice.

1.6.5. **Determinación del punto de fluidez**

Véase el apéndice.

2. **RESULTADOS**

En determinados casos es necesaria la corrección del termómetro,

3. **INFORME**

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

— método utilizado,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa,

— estimación de la precisión.

El punto de fusión indicado en el informe será la media entre dos mediciones, como mínimo, situadas en la zona de la precisión estimada (véase el cuadro).

▼B

Si la diferencia entre las temperaturas al comienzo y al final de la fusión se encuentra dentro de los límites de precisión del método, la temperatura leída en la fase final de la fusión se considerará el punto de fusión; de lo contrario, se indicarán las dos temperaturas.

Si la sustancia se descompone o se sublima antes de alcanzar el punto de fusión, se indicará la temperatura a la que se observa el efecto.

Deben indicarse todas las informaciones y observaciones que se consideren útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C (81) 30 Final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics., Butterworths, Londres, 1975, vol. II, 803-834.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd. ed., Interscience Publ., Nueva York, 1959, Vol I, Part I, Chapter VII.

(4) IUPAC, Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, Pure and Applied Chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

▼B

*Apéndice*

*Para más detalles técnicos, se pueden consultar, por ejemplo, las normas siguientes:*

1. **Métodos de tubo capilar**

1.1. Dispositivos con baño líquido

| | |
|---|---|
| ASTM E 324-69 | Standard Test Method for Relative Initial and Final Melting Points and the Melting Range of Organic Chemicals |
| BS 4634 | Method for the Determination of Melting Point and/or Melting Range |
| DIN 53181 | Bestimmung des Schmelzintervalles von Harzen nach Kapillarverfahren |
| J1S K 00-64 | Testing Methods for Melting Point of Chemical Products |

1.2. Dispositivos con bloque metálico

| | |
|---|---|
| DIN 53736 | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristalimen Kunststoffen |
| ISO 1218 (E) | Plastics — polyamides — determination of «melting point» |

2. **Métodos de superficie caliente**

2.1. Placa caliente de Kofler

| | |
|---|---|
| ANSI/ASTM *D* 3451-76 | Standard Recommended Practices for Testing Polymeric Powder Coatings |

2.2. Microscopio de fusión

| | |
|---|---|
| DIN 53736 | Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristaliinen Kunststoffen |

2.3. Método de menisco (poliamidas)

| | |
|---|---|
| ISO 1218 (E) | Plastics-Polyamides-Decermination of «Melting- Point» |

▼B

| | |
|---|---|
| ANSI/ASTM D 2133-66 | Standard Specification for Acetal Resin Injection Moulding and Extrusion Materials |
| NF T 51050 | Resines de polyamides. Determination du «point de fusion-. Méthode du ménisque» |

3. **Métodos de determinación del punto de congelación**

| | |
|---|---|
| BS 4633 | Method for the Determination of Crystallizing Point |
| BS 4695 | Method for Determination of Melting Point of Petroleum Wax (Cooling Curve) |
| DIN 51421 | Besrimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftsroffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen |
| ISO 2207 | Cires de pétrole: determination de la temperature de figeage |
| DIN 53175 | Besrimmung des Erstarrungspunktes von Fettsauren |
| NF T 60-114 | Point de fusion des paraffines |
| NF T 20-051 | Méthode de détermination du point de cristalisation (point de congelation) |
| ISO 1392 | Method for the determination of the freezing point |

4. **Análisis térmico**

4.1. Análisis térmico diferencial

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of, differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |

▼B

| | |
|---|---|
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalyrical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse, Begriffe |

4.2. Calorimetría diferencial de barrido

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating *to* thermal analysis |
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse, Begriffe |

5. **Determinación del punto de fusión**

| | |
|---|---|
| NBN 52014 | Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite — Monsterneming en ontieding van aardolieproducten: Troebelingspunt en vloeipunt |
| ASTM D 97-66 | Standard test method for pour point of petroleum oils |
| ISO 3016 | Petroleum oils — Determination of pour point. |

▼B

## A.2. PUNTO DE EBULLICIÓN

### 1. MÉTODO

La mayoría de los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en las referencias (2) y (3).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos y dispositivos aquí descritos pueden aplicarse a las sustancias líquidas y de bajo punto de fusión que no sufran reacción química por debajo del punto de ebullición (por ejemplo, autooxidación, redistribución, degradación, etc.). Los métodos son aplicables a las sustancias líquidas puras e impuras.

La importancia dada a la descripción de los métodos basados en la detección fotoeléctrica y en el análisis térmico se debe al hecho de que estos métodos permiten determinar no solo el punto de fusión sino también el punto de ebullición. Además, las medidas pueden efectuarse de manera automática.

El «método dinámico» tiene la ventaja de poder utilizarse igualmente para la determinación de la presión de vapor y hacer innecesaria la corrección de la temperatura de ebullición para llevarla a las condiciones normales de presión (101,325 kPa), ya que durante la medición se puede ajustar la presión normal mediante un manostato.

*Observaciones*

La influencia de las impurezas en la determinación del punto de ebullición depende mucho de la naturaleza de la impureza. Si en la muestra hay impurezas volátiles, que pudieran afectar a los resultados, puede procederse a purificar la sustancia.

### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La temperatura de ebullición normal se define como la temperatura en que la presión de vapor de un líquido es 101,325 kPa.

Si la temperatura de ebullición no se mide a la presión atmosférica normal, la dependencia de la presión de vapor respecto a la temperatura puede calcularse cuantitativamente por la ecuación de Clausius-Clapeyron:

$$\log p = \frac{\Delta H_v}{2{,}3\ RT} + constante$$

donde

p = presión de vapor de la sustancia en pascales

$\Delta H_v$ = su calor de vaporización en J $mol^{-1}$

R = constante universal de los gases = 8,314 J $mol^{-1}$ $K^{-1}$

T = temperatura termodinámica, expresada en K.

La temperatura de ebullición se establece con relación a la presión ambiente en el momento de la medición.

▼B

*Conversiones*

Presión (unidad: kPa)

100 kPa = 1 bar = 0,1 MPa

(todavía se permite la unidad «bar» pero no es recomendable).

133 Pa = 1 mm Hg

1 Torr (no se permite la unidad «Torr» ni «mm Hg»).

1 atm = atmósfera normal = 101 325 Pa

(no se permite la unidad «atm»).

Temperatura (unidad: K)

t = T - 273,15

t: temperatura Celsius, grado Celsius ($^{o}$C)

T: temperatura termodinámica, Kelvin (K)

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Dichas sustancias de referencia sirven esencialmente para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados según otros métodos.

En los métodos enumerados en el apéndice figuran algunas sustancias de calibración.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Cinco métodos de determinación del punto de ebullición (o del intervalo de ebullición) se basan en la medición de la temperatura de ebullición; otros dos se basan en el análisis térmico.

1.4.1. **Método del ebullómetro**

Aunque en un principio los ebullómetros se pensaron para determinar el peso molecular por elevación del punto de ebullición, se prestan también para realizar mediciones exactas del punto de ebullición. En la norma ASTM D 1120-72 (véase el apéndice), se describe un aparato muy sencillo. En dicho aparato, el líquido se calienta en condiciones de equilibrio a la presión atmosférica hasta ebullición.

1.4.2. **Método dinámico**

Este método se basa en la medición de la temperatura de recondensación del vapor mediante un termómetro adecuado que se coloca en el reflujo durante la ebullición. En este método puede modificarse la presión.

1.4.3. **Método de destilación para el punto de ebullición**

Este método se basa en la destilación del líquido, la medida de la temperatura de recondensación del vapor y la determinación de la cantidad de destilado.

▼B

1.4.4. **Método de Siwoloboff**

Se calienta una muestra en un tubo de ensayo, que se sumerge en un baño caliente. Se introduce en el tubo de ensayo un capilar cerrado, con una burbuja de aire en su parte inferior.

1.4.5. **Detección fotoeléctrica**

De acuerdo con el principio de Siwoloboff, la ascensión de las burbujas permite una medición fotoeléctrica automática.

1.4.6. **Análisis térmico diferencial**

Esta técnica registra la diferencia de temperatura entre la sustancia y un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Cuando la muestra sufre una transición que implique un cambio de entalpia, ese cambio se indica con una desviación endotérmica (ebullición) respecto a la línea base del registro de temperatura.

1.4.7. **Calorimetría diferencial de barrido**

Esta técnica registra la diferencia de aporte energético a una sustancia y a un material de referencia en función de la temperatura, cuando la sustancia y el material de referencia se someten al mismo programa de temperatura controlada. Esta energía es la energía necesaria para establecer una diferencia de temperatura nula entre la sustancia y el material de referencia. Cuando la muestra sufre una transición que implique un cambio de entalpia, ese cambio se indica con una desviación endotérmica (ebullición) respecto a la línea base del registro de flujo de calor.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La aplicación y la precisión de los diferentes métodos utilizados para determinar el punto de ebullición/intervalo de ebullición se indican en el cuadro 1.

*Cuadro 1*

**Comparación de los métodos**

| Método de medición | Precisión estimada | Norma existente |
|---|---|---|
| Ebullómerro | ± 1,4 K (hasta 373 K) (1) (2)<br>± 2,5 K (hasta 600 K) (1) (2) | ASTM D 1120-72 (1) |
| Método dinámico | ± 0,5 k (hasta 600 K) (2) | |
| Método de destilación (intervalo de ebullición) | ± 0,5 k (hasta 600 K) | ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71 |
| Método de Siwoloboff | ± 2 K (hasta 600 K) (2) | |
| Detección fotoeléctrica | ± 0,3 K (a 373 K) (2) | |
| Calorimetría térmica diferencial | ± 0,5 K (hasta 600 K) ± 2,0 K (hasta 1 273 K) | ASTM E 537-76 |
| Calorimetría diferencial de barrido | ± 0,5 K (hasta 600 K) ± 2,0 K (hasta 1 273 K) | ASTM E 537-76 |

(1) Esta precisión solo es válida para aparatos sencillos, como el descrito en la norma ASTM D 1120-72; es posible mejorarla utilizando ebullómetros más perfeccionados.
(2) Válido solamente para sustancias puras. El uso en otras circunstancias debe justificarse.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

En las normas internacionales y nacionales (véase el apéndice) se describen los procedimientos de algunos métodos de ensayo.

1.6.1. **Ebullómetro**

Véase el apéndice.

1.6.2. **Método dinámico**

Véase el método de ensayo A.4 para la determinación de la presión de vapor.

Se considera como temperatura de ebullición la registrada a una presión de 101,325 kPa,

1.6.3. **Método de destilación (intervalo de ebullición)**

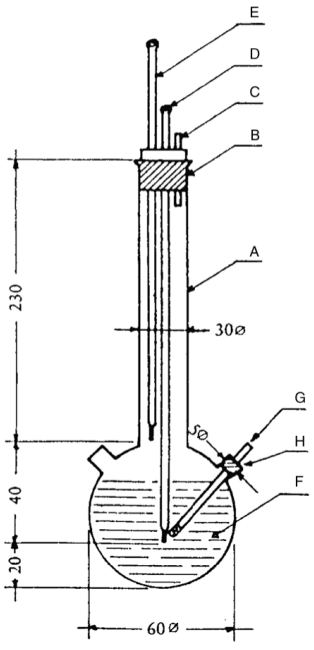
Véase el Apéndice,

1.6.4. **Método de Siwoloboff**

Se introduce la muestra en un tubo de muestra de unos 5 mm de diámetro y se calienta en un aparato apropiado para determinar el punto de fusión (véase la figura 1).

En la figura 1 hay un ejemplo de aparato normalizado apropiado para determinar el punto de fusión y el punto de ebullición (JIS K 0064). Las dimensiones están expresadas en milímetros. El aparato es de vidrio.

*Figura 1*




A = Matraz de medida
B = Tapón
C = Tubo de ventilación
D = Termómetro
E = Termómetro auxiliar
F = Baño líquido
G = Tubo de muestra (5 mm de diámetro exterior como máximo) con un tubo capilar de unos 100 mm de longitud, alrededor de 1 mm de diámetro interior, y alrededor de 0,2 o 0,3 mm de espesor de la pared
H = Tubo lateral

En el tubo de muestra que contiene la sustancia se introduce un tubo capilar (capilar de ebullición), cerrado a aproximadamente 1 cm de su extremo inferior. El nivel hasta el que se añade la sustancia problema es tal que la parte cerrada del capilar quede situada por debajo de la superficie del líquido. El tubo de muestra con el capilar de ebullición debe estar unido al termómetro mediante una cinta elástica o un soporte lateral (véase la figura 2).

▼B

*Figura 2*

**Método de Siwoloboff**

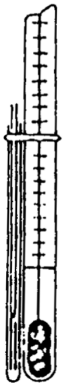
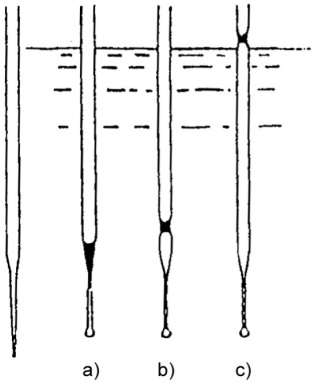


*Figura 3*

**Método modificado**




El líquido del baño se elige en función de la temperatura de ebullición. Se puede utilizar aceite de silicona para temperaturas de hasta 573 K. La parafina liquida solo puede usarse para temperaturas inferiores a 473 K. Al principio, el calentamiento del baño debe graduarse de manera que se obtenga un aumento de temperatura de 3 K por minuto. Hay que agitar el líquido del baño. A unos 10 K por debajo del punto de ebullición supuesto, se reduce el calentamiento de tal manera que el aumento de la temperatura no llegue a 1 K/minuto. Al acercarse a la temperatura de ebullición, comienzan a salir rápidamente burbujas del capilar de ebullición.

El punto de ebullición se define como la temperatura a la cual, en un enfriamiento momentáneo, se interrumpe el rosario de burbujas y el líquido comienza a elevarse súbitamente por el capilar. La temperatura leída en el termómetro en ese preciso momento corresponde a la temperatura de ebullición de la sustancia de ensayo.

En el método modificado (véase la figura 3), el punto de ebullición se determina en un capilar de punto de fusión. Este último se alarga en una punta fina de unos 2 cm de longitud (a) y se aspira hacia el interior una pequeña cantidad de sustancia. El extremo abierto del fino capilar se cierra por fusión, de forma que quede una pequeña burbuja de aire en el extremo. Al calentarla en el aparato de punto de fusión (b), la burbuja de aire se va dilatando. El punto de ebullición corresponde a la temperatura a la que el tapón de muestra llega al nivel de la superficie del baño de líquido (c).

1.6.5. **Detección fotoeléctrica**

Se calienta una muestra de la sustancia en un tubo capilar colocado dentro de un bloque metálico de calentamiento.

Por las aberturas practicadas en el bloque, se envía un haz de luz a través de la sustancia hacia una célula fotoeléctrica calibrada en forma precisa.

Durante el aumento de la temperatura de la muestra, van escapando del capilar de ebullición algunas burbujas aisladas de aire. Cuando se alcanza la temperatura de ebullición, el número de burbujas aumenta mucho. La consiguiente modificación de la intensidad luminosa es registrada por la célula, que envía una señal de interrupción al indicador que da la temperatura de un termómetro de resistencia de platino colocado en el bloque.

Este método es especialmente útil, pues permite efectuar determinaciones por debajo de la temperatura ambiente hasta 253,15 K (-20 $^{o}$C) sin ninguna modificación del aparato. Basta con colocar este en un baño refrigerante

▼B

1.6.6. **Análisis térmico**

1.6.6.1. *Análisis térmico diferencial*

Véase el apéndice.

1.6.6.2. *Calorimetría diferencial de barrido*

Véase el apéndice.

2. **RESULTADOS**

Cuando haya diferencias pequeñas respecto a la presión normal (máxima de ± 5 kPa), las temperaturas del punto de ebullición podrán normalizarse a $T_n$ mediante la ecuación de valor numérico de Sidney Young:

$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$

donde

A p = (101,325 — p) [atención al signo]

p = medida de la presión, en kPa

$f_T$ = tasa de variación del punto de ebullición con la presión, en K/kPa

T = valor medido de la temperatura de ebullición, en K

$T_n$ = valor de la temperatura de ebullición corregido a presión normal, en K.

Los factores de corrección de la temperatura ($f_T$) y las ecuaciones para su aproximación figuran en las normas internacionales citadas en el texto para numerosas sustancias.

Por ejemplo, el método DIN 53171 presenta las siguientes correcciones aproximadas para disolventes contenidos en las pinturas:

*Cuadro 2*

**Factores de corrección de la temperatura ($f_t$)**

| Temperatura T en K | Factor de corrección $f_T$ en K/kPa |
|---|---|
| 323,15 | 0,26 |
| 348,15 | 0,28 |
| 373,15 | 0,31 |
| 398,15 | 0,33 |
| 423,15 | 0,35 |
| 448,15 | 0,37 |
| 473,15 | 0,39 |
| 498,15 | 0,41 |
| 523,15 | 0,44 |
| 548,15 | 0,45 |
| 573,15 | 0,47 |

▼B

3. **INFORME**

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

— método utilizado,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa,

— estimación de la precisión.

El punto de ebullición registrado será la media entre dos mediciones, como mínimo, situadas en la zona de precisión estimada (véase el cuadro 1).

Deberán indicarse los valores medidos de los puntos de ebullición así como su media, y la presión o presiones a que se hayan efectuado las mediciones deberán registrarse en kPa. La presión debe, preferentemente, ser próxima a la presión atmosférica normal.

Deben suministrarse todas las informaciones y observaciones que se consideren útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 103 — Decision of the Council C (81) 30 final.

(2) IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, Londres 1975, vol. II.

(3) R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., Nueva York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VIII.

▼B

*Apéndice*

*Para más detalles técnicos, se pueden consultar las normas siguientes:*

1. **Ebullómetro**

| | |
|---|---|
| ASTM D 1120-72 | Standard test method for boiling point of engine anti-freezes |

2. **Método de destilacion (intervalo de ebullicion)**

| | |
|---|---|
| ISO/R 918 | Test method for distillation (distillation yield and distillation range) |
| BS 4349/68 | Method for determination of distillation of petroleum products |
| BS 4591/'71 | Method for the determination of distillation characteristics |
| DIN 53171 | Losungsmittel fur Anstrichstoffe. Bestimmung des Siedeverlaufes |
| NF T 20-608 | Distillation; determination du rendement et de l'intervalle de distillation |

3. **Analisis termico diferencial y calorimetria diferencial de barrido**

| | |
|---|---|
| ASTM E 537-76 | Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis |
| ASTM E 473-85 | Standard definitions of terms relating to thermal analysis |
| ASTM E 472-86 | Standard practice for reporting thermoanalytical data |
| DIN 51005 | Thermische Analyse: Begriffe |

▼B

## A.3. DENSIDAD RELATTVA

### 1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en la referencia (2).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos descritos de determinación de la densidad relativa son aplicables a las sustancias sólidas y líquidas, cualquiera que sea su grado de pureza. En el cuadro 1 se indican los diversos métodos utilizables.

### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La densidad relativa, $D^{20}_4$, de los sólidos o líquidos es la relación entre la masa de un volumen de sustancia problema, determinada a 20 °C, y la masa del mismo volumen de agua, determinada a 4 °C. La densidad relativa es un número adimensional.

La densidad, p, de una sustancia es el cociente de su masa m por su volumen v.

En unidades SI, la densidad, p, se expresa en kilogramos por metro cúbico.

### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA (1) (3)

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una nueva sustancia. Deben utilizarse, esencialmente, para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos,

### 1.4. PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS

Se aplican cuatro clases de métodos.

#### 1.4.1. **Métodos de flotabilidad**

1.4.1.1. *Areómetro* (para líquidos)

Se pueden obtener determinaciones de densidad suficientemente precisas y rápidas con areómetros flotantes, que permiten deducir la densidad de un líquido a partir de la profundidad de inmersión leída en una escala graduada.

1.4.1.2. *Balanza hidrostática* (para sustancias líquidas y sólidas)

La diferencia entre el peso de una muestra medido en el aire y en un líquido adecuado (como el agua) puede servir para determinar su densidad.

En el caso de los sólidos, la densidad medida solo es representativa de la muestra utilizada en concreto. Para determinar la densidad de un líquido, se pesa un cuerpo, con un volumen v conocido, primero en el aire y luego en el líquido.

1.4.1.3. *Método del cuerpo sumergido* (para las sustancias líquidas) (4)

En este método, la densidad de un líquido se determina a partir de la diferencia entre los resultados de la pesada del líquido, antes y después de sumergir un cuerpo de volumen conocido en dicho líquido problema.

▼B

1.4.2. **Métodos picnométricos**

Para sólidos o líquidos, se pueden utilizar picnómetros de diversas formas cuyos volúmenes sean conocidos. La densidad se calculará a partir de la diferencia de peso entre el picnómetro lleno y el picnómetro vacío, por una parte, y de su volumen conocido, por la otra.

1.4.3. **Picnómetro de comparación de aire** (para sólidos)

La densidad de un sólido, cualquiera que sea su forma, se puede medir a la temperatura ambiente mediante un picnómetro de comparación de gases. El volumen de una sustancia en el aire o en un gas inerte se mide en una probeta calibrada de volumen variable. Para el cálculo de la densidad, se efectúa una medida de la masa después de la medida del volumen.

1.4.4. **Densímetro oscilante** (5) (6) (7)

La densidad de un líquido se puede medir con un densímetro oscilante. Un oscilador mecánico con forma de tubo en U se hace vibrar a la frecuencia de resonancia del oscilador, que depende de su masa. La introducción de una muestra modifica la frecuencia de resonancia del oscilador, el cual debe calibrarse con ayuda de dos sustancias líquidas de densidades conocidas. Las sustancias deben elegirse de tal manera que sus densidades cubran el intervalo de medición.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

En el cuadro se indica la aplicabilidad de los diferentes métodos que se utilizan para determinar la densidad relativa.

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Las referencias de las normas citadas como ejemplo, las cuales pueden consultarse para obtener detalles técnicos suplementarios, figuran en el apéndice.

Los ensayos deberán realizarse a la temperatura de 20 $^{o}$C y deben hacerse, al menos, dos medidas.

2. **RESULTADOS**

Véanse las normas.

3. **INFORME**

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

— método utilizado,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa.

También se indicarán tanto la densidad relativa, $D_4^{20}$, según lo definido en el punto 1.2, como el estado físico de la sustancia examinada,

Deben suministrarse todas las informaciones y observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

▼B

*Cuadro*

**Aplicabilidad de los métodos**

| Método de medida | Densidad | | Viscosidad dinámica máxima posible | Normas existentes |
|---|---|---|---|---|
| | sólido | líquido | | |
| 1.4.1.1. Areómetro | | Sí | 5 Pa s | ISO 387,<br>ISO 649-2,<br>NF T 20-050 |
| 1.4.1.2. Balanza hidrostática | | | | |
| a) sólidos | Sí | | | ISO 1183 (A) |
| b) líquidos | | Sí | 5 Pa S | ISO 901 y 758 |
| 1.4.1.3. Método del cuerpo sumergido | | Sí | 20 Pa s | DIN 53217 |
| 1.4.2. Picnómetro | | | | ISO 3507 |
| a) sólidos | Sí | | | ISO 1183 (B),<br>NF T 20-053 |
| b) líquidos | | Sí | 500 Pa s | ISO 758 |
| 1.4.3. Picnómetro de comparación de aire | Sí | | | DIN 55990 parte 3, DIN 53243 |
| 1.4.4. Densímetro oscilante | | Si | 5 Pa s | |

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 109 — Decisión of the Council C (81) 30 Final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry. Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Chapter IV, Interscience Publ. Nueva York, 1959, Vol. I, Part 1,

(3) IUPAC, Recommended reference materials for realizatíon of physico-chemical properties. — Pure and Applied Chemistry, 1976, Vol. 48, 508.

(4) Wagenbreth, H., Die Tauchkugel zur Besrimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen tm, 1979, Vol 11, 427-430.

(5) Leopold, H., Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 1970, Vol. 19, 297-302.

(6) Baumgarten, D., Füllmengenkontrolle bei vorgepackten Erzeugnissen — Verfahren zur Dichtebestim-mung bei flüssigen Produkten und ihre praktische Anwendung, Die Pharmazeurische Industrie, 1975, Vol. 37, 717-726.

(7) Riemann, J., Der Einsatz der digitalen Dichtemessung im Brauereilaboratorium, Brauwissenscbaft, 1976, Vol. 9, 253-255.

▼B

*Apéndice*

*Para más detalles técnicos, se pueden consultar las normas siguientes:*

1. **Métodos de flotabilidad**

1.1. Areómetro

| | |
|---|---|
| DIN 12790, ISO 387 | Hydrometer: general instructions |
| DIN 12791 | Part I: Density hydrometers; construction, adjustment and use<br>Part II: Density hydxometers; standardised sizes, designation<br>Part III: Use and test |
| ISO 649-2 | Laboratory glassware: Density hydrometers for general purpose |
| NF T 20-050 | Chemical products for industrial use — Determination of density of liquids — Areometric method |
| DIN 12793 | Laboratory glassware: range find hydrometers |

1.2. Balanza hidrostática

*Para sustancias sólidas*

| | |
|---|---|
| ISO 1183 | Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics |
| NF T 20-049 | Chemical products for industrial use — Determination of the density of solids other than powders and cellular products — Hydrostatic balance method |
| ASTM-D-792 | Specific gravity and density of plastics by displacement |
| DIN 53479 | Testing of plastics and elastomers; determination of density |

*Para sustancias líquidas*

| | |
|---|---|
| ISO 901 | ISO 758 |

▼B

| | |
|---|---|
| DIN 51757 | Testing of mineral oils and related materials; determination of density. |
| ASTM D 941-55, ASTM D 12 96-67 y ASTM D 1481-62 | |
| ASTM D 1298 | Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method |
| BS 4714 | Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method |

1.3. Métodos del cuerpo sumergido

| | |
|---|---|
| DIN 53217 | Testing of paints, varnishes and similar coating materials; determination of density; immersed body method |

2. **Métodos picnométricos**

2.1. Para sustancias líquidas

| | |
|---|---|
| ISO 3507 | Pycnometers |
| ISO 758 | Liquid chemical products; determination of density at 20 $^{o}$C |
| DIN 12797 | Gay-Lussac pycnometer (for non-volatile liquids which are not too viscous) |
| DIN 12798 | Lipkin pyenometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100,$10^{-6}$ $m^{2-1}$ at 15 $^{o}$C) |
| DIN 12800 | Sprengel pycnometer (for liquids as DIN 12798) |
| DIN 12801 | Reischauer pycnometer (for liquids with a kinematic viscosity of less than 100,10—$^{6}$ $m^{2}$ $s^{-1}$ at 20 $^{o}$C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approxi mately 1 bar at 90 $^{o}$C) |

▼B

| | |
|---|---|
| DIN 12806 | Hubbard pycnometer (for viscous liquids of all types which do not have a too high vapour pressure, in particular also for paints, varnishes and bitumen) |
| DIN 12807 | Bingham pycnometer (for liquids, as in DIN 12801) |
| DIN 12808 | Jaulmes pycnometer (in particular for ethanol-water mixture) |
| DIN 12809 | Pycnometer with ground-in thermometer and capillary side tube (for liquids which are not too viscous) |
| DIN 53217 | Testing of paints, varnishes and similar products; determination of density by pycnometer |
| DIN 51757 | Point 1: Testing of mineral oils and related materials; determination of density |
| ASTM D 297 | Section 15: Rubber products — chemical analysis |
| ASTM D 2111 | Method C: Halogenated organic compounds |
| BS 4699 | Method for determination of specific gravity and density of petroleum products (graduated bicapillary pycnometer method) |
| BS 5903 | Method for determination of relative density and density of petroleum products by the capillary-stoppered pycnometer method |
| NF T 20-053 | Chemical products for industrial use— Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method |

▼B

2.2. Para sustancias sólidas

| | |
|---|---|
| ISO 1183 | Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics. |
| NF T 20-053 | Chemical products for industrial use — Determination of density of solids in powder and liquids — Pyknometric method |
| DIN 19683 | Determination of the density of soils |

3. **Picnómetro de comparación de aire**

| | |
|---|---|
| DIN 55990 | Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte |
| DIN 53243 | Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung |

▼M1

## A.4. PRESIÓN DE VAPOR

### 1. MÉTODO

El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 104 (2004).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La presente versión revisada del método A.4 (1) añade un método más (método de efusión: termogravimetría isotérmica) pensado para sustancias con presiones muy bajas (hasta un límite inferior de $10^{-10}$ Pa). Teniendo presentes las necesidades en lo que se refiere a procedimientos, especialmente en relación con la obtención de la presión de vapor de sustancias en la que esta es baja, se reexamina asimismo la aplicabilidad en intervalos distintos de otros procedimientos de este método.

En situación de equilibrio termodinámico, la presión de vapor de una sustancia pura depende exclusivamente de la temperatura. Los principios fundamentales se describen en otro lugar (2) y (3).

No existe ningún procedimiento de medida que sea aplicable a toda la gama de presiones de vapor, desde menos de $10^{-10}$ hasta $10^5$ Pa. Se incluyen en el presente método ocho procedimientos de medición de la presión de vapor aplicables a distintos intervalos de presión de vapor. En el cuadro 1 se comparan todos ellos en lo que se refiere a aplicación e intervalo de medida. Los métodos solo pueden aplicarse a compuestos que no se descompongan en las condiciones del ensayo. Cuando, por motivos técnicos, no puedan aplicarse los métodos experimentales, se puede recurrir a una estimación de la presión de vapor. En el apéndice figura un método de estimación recomendado.

### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La presión de vapor de una sustancia se define como la presión de saturación de la misma en equilibrio con su fase líquida o sólida.

Debe utilizarse la unidad de presión del SI, que es el pascal (Pa). A continuación se citan otras unidades que se han empleado históricamente, indicando sus factores de conversión:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 1 Torr | = | 1 mm Hg | = | $1{,}333 \times 10^2$ Pa |
| 1 atmósfera | = | $1{,}013 \times 10^5$ Pa | | |
| 1 bar | = | $10^5$ Pa | | |

La unidad de temperatura en el SI es el Kelvin (K). La conversión de grados Celsius a Kelvin se realiza mediante la fórmula:

$$T = t + 273{,}15$$

donde T es la temperatura termodinámica o Kelvin y t es la temperatura Celsius.

▼**M1**

*Cuadro 1*

| Método de medida | Sustancias | | Repetibilidad estimada | Reproducibilidad estimada | Intervalo recomendado |
|---|---|---|---|---|---|
| | sólidas | líquidas | | | |
| Método dinámico | bajo punto de fusión | Sí | hasta el 25 %<br>del 1 al 5 % | hasta el 25 %<br>del 1 al 5 % | $10^3$ a $2 \times 10^3$ Pa<br>$2 \times 10^3$ a $10^5$ Pa |
| Método estático | Sí | Sí | del 5 al 10 % | del 5 al 10 % | 10 a $10^5$ Pa<br>$10^{-2}$ a $10^5$ Pa [1] |
| Método del isoteniscopio | Sí | Sí | del 5 al 10 % | del 5 al 10 % | $10^2$ a $10^5$ Pa |
| Método de efusión: balanza de presión de vapor | Sí | Sí | del 5 al 20 % | hasta el 50 % | $10^{-3}$ a 1 Pa |
| Método de efusión: celda de Knudsen | Sí | Sí | del 10 al 30 % | — | $10^{-10}$ a 1 P |
| Método de efusión: termogravimetría isotérmica | Sí | Sí | del 5 al 30 % | hasta el 50 % | $10^{-10}$ a 1 Pa |
| Método de saturación de gases | Sí | Sí | del 10 al 30 % | hasta el 50 % | $10^{-10}$ a $10^3$ Pa |
| Método del rotor | Sí | Sí | del 10 al 20 % | — | $10^{-4}$ a 0,5 Pa |

[1] Cuando se usa un manómetro de capacitancia.

1.3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Por regla general, se determina la presión de vapor a distintas temperaturas. En un intervalo de temperaturas limitado, el logaritmo de la presión de vapor de una sustancia pura es función lineal de la inversa de la temperatura termodinámica, con arreglo a la ecuación de Clapeyron-Clausius simplificada:

$$\log p = \frac{\Delta Hv}{2{,}3RT} + constante$$

donde:

p = presión de vapor en pascales

ΔHv = calor de vaporización en J $mol^{-1}$

R = constante universal de los gases, 8,314 J $mol^{-1}$ $K^{-1}$

T = temperatura en K.

▼M1

1.4. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es preciso utilizar sustancias de referencia. Sirven fundamentalmente para comprobar de vez en cuando el comportamiento de un método y para poder comparar los resultados obtenidos según distintos métodos.

1.5. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

1.5.1. **Método dinámico (método de Cottrell)**

1.5.1.1. *Principio*

La presión de vapor se determina midiendo el punto de ebullición de la sustancia a diversas presiones especificadas comprendidas entre $10^3$ y $10^5$ Pa aproximadamente. Este método se recomienda también para la determinación de la temperatura de ebullición. Para tal fin es útil hasta 600 K. Las temperaturas de ebullición de los líquidos a una profundidad de 3 o 4 cm son superiores a las de la superficie en aproximadamente 0,1 °C, a causa de la presión hidrostática de la columna de líquido. En el método de Cottrell (4), el termómetro se coloca en el vapor por encima de la superficie del líquido y se obliga al líquido en ebullición a bombearse continuamente sobre el bulbo del termómetro. Una fina capa de líquido que está en equilibrio con el vapor a presión atmosférica cubre el bulbo. De este modo, la lectura del termómetro indica el verdadero punto de ebullición, sin errores debidos al supercalentamiento o a la presión hidrostática. En la figura 1 se muestra la bomba empleada originalmente por Cottrell. El tubo A contiene el líquido en ebullición. Un hilo de platino B fijado en el fondo contribuye a que la ebullición sea uniforme. El tubo lateral C desemboca en un condensador, y el revestimiento D impide al condensado frío llegar al termómetro E. Cuando el líquido en A hierve, las burbujas y el líquido atrapados por el embudo se vierten a través de los dos brazos de la bomba F sobre el bulbo del termómetro.

*Figura 1*

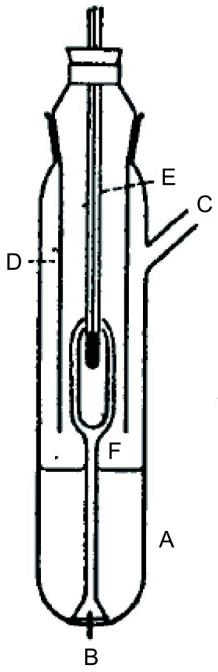
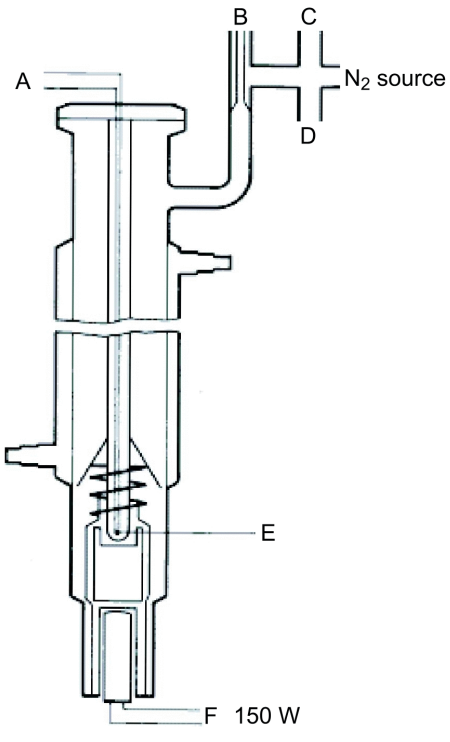



*Figura 2*



▼**M1**

Bomba de Cottrell (4)

A: Termopar

B: Volumen tampón de vacío

C: Indicador de presión

D: Vacío

E: Punto de medida

F: Elemento calefactor de unos 150 W

1.5.1.2. *Aparato*

La figura 2 muestra un aparato muy exacto que aplica el principio de Cottrell. Consta de un tubo con una sección de ebullición en la parte inferior, un refrigerante en la media y una salida y una pestaña en la superior. La bomba de Cottrell se coloca en la sección de ebullición, que se calienta por medio de un cartucho eléctrico. La temperatura la mide un termopar de camisa o un termómetro de resistencia introducido a través de la pestaña de la parte superior. La salida se conecta al sistema de regulación de la presión, integrado por una bomba de vacío, un volumen tampón, un manostato para admitir nitrógeno con fines de regulación de la presión y un manómetro.

1.5.1.3. *Procedimiento*

Se coloca la sustancia en la sección de ebullición. Los sólidos no pulverulentos pueden presentar problemas, que a veces se resuelven calentando la camisa de refrigeración. Se cierra el aparato con la pestaña y se extrae el gas de la sustancia. Este método no es aplicable a las sustancias que formen espuma.

Se regula a la presión más baja prevista y se acciona el sistema de calentamiento, conectando, simultáneamente, el termosensor a un registrador.

Cuando éste indique una temperatura de ebullición fija, a presión constante, se habrá alcanzado el equilibrio. Hay que evitar las sacudidas durante la ebullición. Además, debe obtenerse condensación completa en el refrigerante. Cuando se determina la presión de vapor de sólidos de bajo punto de fusión, hay que evitar que se bloquee el condensador.

Una vez registrado el punto de equilibrio, se regulará a una presión más elevada y se irá repitiendo de nuevo el mismo proceso hasta que se alcance una presión de $10^5$ Pa (en total, de 5 a 10 medidas). Los puntos de equilibrio deben repetirse a presiones decrecientes para comprobar los resultados.

1.5.2. **Método estático**

1.5.2.1. *Principio*

En el método estático (5), se determina la presión de vapor en equilibrio termodinámico a una temperatura especificada. Este método resulta adecuado para sustancias y líquidos y sólidos multicomponente en el intervalo comprendido entre $10^{-1}$ y $10^5$ Pa y, si se pone el debido cuidado, también en el comprendido entre 1 y 10 Pa.

▼**M1**

1.5.2.2. *Aparato*

El aparato consta de un baño de temperatura constante (precisión de ± 0,2 K), un recipiente para la muestra conectado a un sistema de vacío, un manómetro y un sistema de regulación de la presión. El compartimento que contiene la muestra (figura 3a) está conectado al sistema de vacío mediante una válvula y un manómetro diferencial (un tubo en forma de U lleno de un líquido manométrico apropiado) que se utiliza como indicador de cero. En el manómetro diferencial cabe utilizar mercurio, siliconas o ftalatos, según el intervalo de presiones y el comportamiento químico de la sustancia problema. Sin embargo, por motivos medioambientales, debe evitarse el uso de mercurio si es posible. La sustancia problema no debe disolverse de forma apreciable ni reaccionar con el líquido del tubo en U. En lugar del tubo en U puede utilizarse un indicador de presión (figura 3b). En el manómetro, el mercurio puede utilizarse en el intervalo desde la presión atmosférica hasta $10^2$ Pa y los aceites de silicona y los ftalatos de $10^2$ Pa a 10 Pa. Existen otros tipos de manómetros que pueden utilizarse por debajo de $10^2$ Pa, y los manómetros de capacidad de membrana calentable pueden utilizarse incluso a presiones inferiores a $10^{-1}$ Pa. La temperatura se mide en la pared exterior del compartimento de la muestra o en el interior del propio compartimento.

1.5.2.3. *Procedimiento*

Utilizando el equipo descrito en la figura 3a, se llena el tubo en U con el líquido previsto, que antes de realizar las lecturas habrá sido desgasificado a temperatura elevada. A continuación se introduce en el equipo la sustancia problema y se desgasifica a temperatura reducida. Si se trata de una muestra multicomponente, la temperatura debe ser lo suficientemente baja para garantizar que la composición del material no se altere. El equilibrio puede alcanzarse más rápidamente agitando. La muestra puede enfriarse con nitrógeno líquido o hielo seco, pero hay que tener precaución para evitar la condensación de aire o del líquido de la bomba. Se abre la llave que hay sobre el recipiente de la muestra y se aplica una succión durante varios minutos para extraer el aire. Si resulta necesario, se repite varias veces la operación de desgasificado.

*Figura 3a*

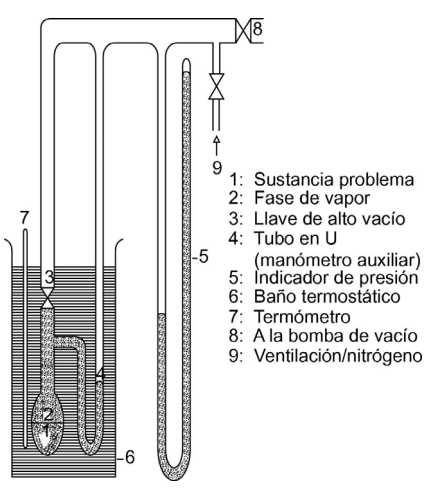
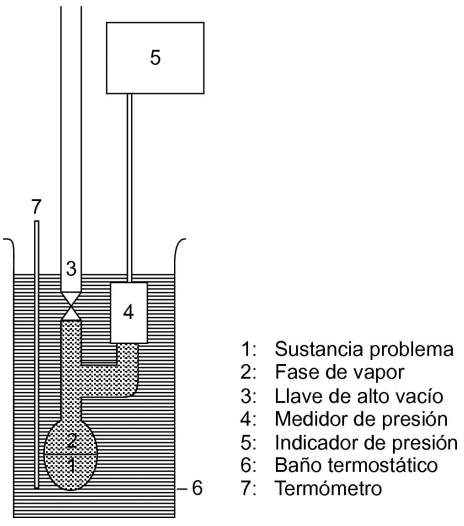



*Figura 3b*



▼**M1**

Al calentar la muestra con la válvula cerrada aumenta la presión de vapor, lo que hace cambiar el equilibrio del líquido del tubo en U. Para compensar este fenómeno, hay que permitir la entrada de nitrógeno o aire en el aparato hasta que el indicador de presión diferencial del manómetro esté otra vez a cero. La presión necesaria para conseguir este efecto puede leerse en el manómetro o en un instrumento de precisión superior, y corresponde a la presión de vapor de la sustancia a esa temperatura concreta de medida. Si se utiliza el equipo descrito en la figura 3b, la lectura de la presión de vapor se efectúa directamente.

La presión de vapor se determina a pequeños intervalos de temperatura adecuados (aproximadamente, entre 5 y 10 puntos de medida en total) hasta llegar a la temperatura máxima prevista.

Las lecturas a baja temperatura deben repetirse como comprobación. Si los valores obtenidos en las lecturas repetidas no coinciden con la curva obtenida al ir aumentando la temperatura, puede deberse a alguna de las situaciones siguientes:

i) la muestra sigue conteniendo aire (por ejemplo, en el caso de materiales de elevada viscosidad) o sustancias de bajo punto de ebullición, que se liberan durante el calentamiento,

ii) la sustancia sufre una reacción química en el intervalo de temperaturas investigado (por ejemplo, descomposición o polimerización).

1.5.3. **Método del isoteniscopio**

1.5.3.1. *Principio*

El isoteniscopio (6) se basa en el principio del método estático. Se trata de colocar una muestra en un bulbo mantenido a temperatura constante y conectado a un manómetro y a una bomba de vacío. Las impurezas más volátiles que la sustancia se eliminan desgasificando a temperatura reducida. La presión de vapor de la muestra a la temperatura seleccionada se equilibra mediante una presión de gas inerte conocida. El isoteniscopio se creó para medir la presión de vapor de determinados hidrocarburos líquidos, pero se presta igualmente a la investigación de sólidos. Este método no suele adecuarse a los sistemas multicomponente. Los resultados exhiben solamente errores leves en el caso de muestras que contengan impurezas no volátiles. El intervalo recomendado es de $10^2$ a $10^5$ Pa.

1.5.3.2. *Aparato*

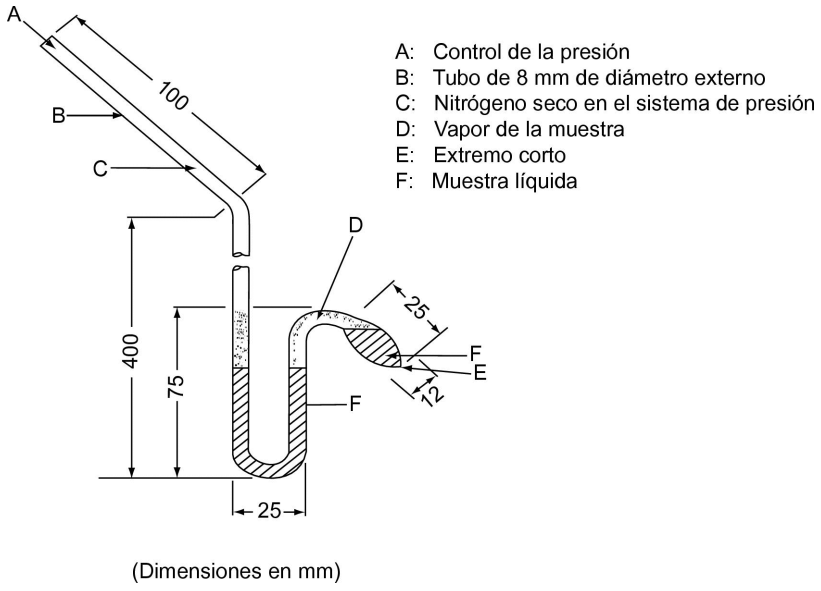
En la figura 4 se muestra un ejemplo de dispositivo de medida. En ASTM D 2879-86 (6) se encontrará una descripción completa.

▼**M1**

1.5.3.3. *Procedimiento*

En el caso de los líquidos, la sustancia misma sirve de líquido de llenado para el manómetro diferencial. Se pone en el isoteniscopio una cantidad de líquido suficiente para llenar el bulbo y el extremo corto del manómetro. El isoteniscopio se une entonces a un sistema de vacío y, después de hacer el vacío en su interior, se llena de nitrógeno. La evacuación y la purga del sistema se repiten dos veces para eliminar el oxígeno residual. El isoteniscopio lleno se coloca en posición horizontal para que la muestra se extienda formando una fina capa en el bulbo de la muestra y en el manómetro. Se reduce a 133 Pa la presión del sistema y se calienta suavemente la muestra hasta que inicie la ebullición (eliminación de gases disueltos). El isoteniscopio se cambia entonces de posición para que la muestra vuelva al bulbo y llene el brazo corto del manómetro. La presión se mantiene a 133 Pa. El extremo alargado del bulbo de la muestra se calienta con una pequeña llama hasta que el vapor originado por la muestra se expande suficientemente para desplazar parte de la muestra desde la porción superior del bulbo y del brazo del manómetro hacia el manómetro, creando así un espacio libre de nitrógeno y lleno de vapor. El isoteniscopio se coloca entonces en un baño termostático y se ajusta la presión del nitrógeno hasta que iguala a la de la muestra. En equilibrio, la presión del nitrógeno es igual a la presión de vapor de la sustancia.

*Figura 4*




(Dimensiones en mm)

En el caso de los sólidos, se utilizarán líquidos manométricos tales como los aceites de silicona o los ftalatos, según el intervalo de temperatura y presión. El líquido manométrico desgasificado se introduce en un engrosamiento del brazo largo del isoteniscopio. A continuación se introduce en el bulbo de la muestra el sólido problema y se desgasifica a temperatura elevada. Después se inclina el isoteniscopio de forma que el líquido manométrico se introduzca en el tubo en U.

▼M1

1.5.4. **Método de efusión: balanza de presión de vapor** (7)

1.5.4.1. *Principio*

Se calienta una muestra de la sustancia problema en un horno pequeño y se introduce en una campana en la que se ha hecho el vacío. El horno está cubierto por una tapa que lleva pequeños orificios de diámetros conocidos. El vapor de la sustancia que escapa por uno de los orificios se conduce al platillo de una balanza de alta sensibilidad que también está encerrada en la campana al vacío. En algunos montajes, el platillo está rodeado por un recinto de refrigeración, que permite que el calor se disipe al exterior por conducción térmica, y enfriado por radiación de manera que el vapor que se escapa se condense sobre él. El impulso del chorro de vapor actúa sobre la balanza como una fuerza. La presión de vapor se puede obtener de dos maneras: directamente a partir de la fuerza ejercida sobre el platillo y también a partir de la velocidad de evaporación utilizando la ecuación de Hertz-Knudsen (2):

$$p = G\sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

donde:

G = velocidad de evaporación (kg $s^{-1}$ $m^{-2}$)

M = masa molar (g $mol^{-1}$)

T = temperatura (K)

R = constante universal de los gases (J $mol^{-1}$ $K^{-1}$)

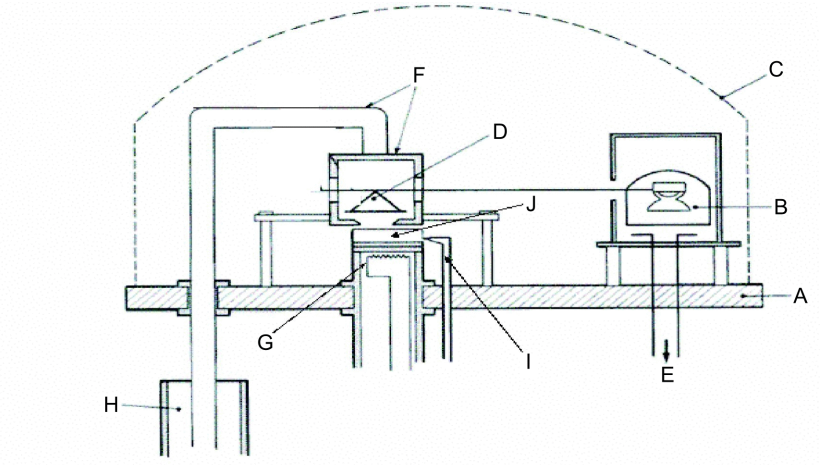
p = presión de vapor (Pa)

El intervalo recomendado es de $10^{-3}$ a 1 Pa.

1.5.4.2. *Aparato*

El principio general del aparato se ilustra en la figura 5.

*Figura 5*




| | | | |
|---|---|---|---|
| A: | Base | F: | Recinto y barra de refrigeración |
| B: | Instrumento de bobina móvil | G: | Horno de evaporación |
| C: | Campana | H: | Termo con nitrógeno líquido |
| D: | Balanza con platillo | I: | Medida de la temperatura de la muestra |
| E: | Dispositivo de medida de vacío | J: | Sustancia problema |

▼M1

1.5.5. **Método de efusión: celda de Knudsen**

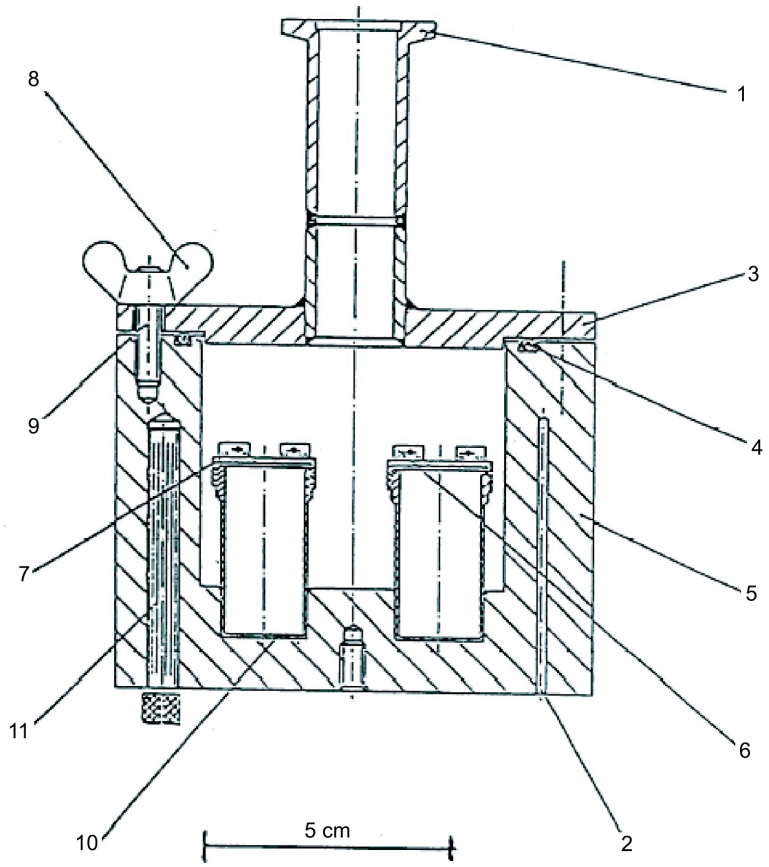
1.5.5.1. *Principio*

El método se basa en la estimación de la masa de la sustancia problema que abandona la celda de Knudsen (8) por unidad de tiempo en forma de vapor a través de un microorificio en condiciones de ultravacío. La masa del vapor objeto de efusión puede obtenerse bien determinando la pérdida de masa de la celda, bien condensando el vapor a baja temperatura y determinando mediante cromatografía la cantidad de sustancia que se ha volatilizado. La presión de vapor se calcula aplicando la relación de Hertz-Knudsen (véase el punto 1.5.4.1) con factores de corrección que dependen de los parámetros del equipo (9). El intervalo recomendado es de $10^{-10}$ a 1 Pa (10) (11) (12) (13) (14).

1.5.5.2. *Aparato*

El principio general del aparato se ilustra en la figura 6.

*Figura 6*




| | | | |
|---|---|---|---|
| 1: | Conexión al vacío | 7: | Tapa de rosca |
| 2: | Espacios para el termómetro de resistencia de platino o medida y control de la temperatura | 8: | Tuercas de mariposa |
| 3: | Tapa del recinto de vacío | 9: | Pernos |
| 4: | Toro | 10: | Células de efusión acero inoxidable |
| 5: | Recinto de aluminio para hacer el vacío | 11: | Cartucho calefactor |
| 6: | Dispositivo para instalar y quitar las células de efusión | | |

▼M1

1.5.6. **Método de efusión: termogravimetría isotérmica**

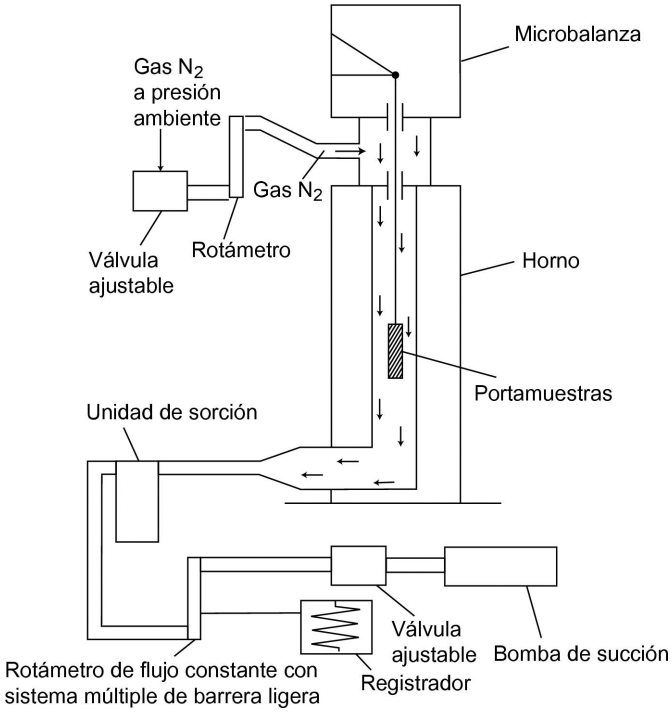
1.5.6.1. *Principio*

El método se basa en la determinación de las velocidades de evaporación aceleradas de la sustancia problema a presión ambiente y temperaturas elevadas usando la termogravimetría (10) (15) (16) (17) (18) (19) (20). Las velocidades de evaporación $v_T$ resultan de exponer el compuesto seleccionado a una atmósfera de gas inerte que fluye lentamente y controlar el peso perdido a temperaturas isotérmicas T en Kelvin definidas a lo largo de períodos de tiempo adecuados. Las presiones de vapor $p_T$ se calculan a partir de los valores $v_T$ utilizando la relación lineal entre el logaritmo de la presión de vapor y el logaritmo de la velocidad de evaporación. Si resulta necesario, puede hacerse una extrapolación a las temperaturas de 20 y 25 °C mediante análisis de regresión de log $p_T$ frente a 1/T. Este método es adecuado para sustancias cuyas presiones de vapor son muy bajas, del orden de $10^{-10}$ Pa ($10^{-12}$ mbar) y cuya pureza se acerca lo más posible al 100 % para evitar errores en la interpretación de las pérdidas de peso medidas.

1.5.6.2. *Aparato*

En la figura 7 se ilustra el principio general del montaje del experimento.

*Figura 7*




El portamuestras, colgado de una microbalanza en un recinto de temperatura controlada, es sometido a una corriente de gas nitrógeno seco que se lleva las moléculas vaporizadas de la sustancia problema. Tras abandonar el recinto, la corriente de gas es purificada por una unidad de sorción.

1.5.6.3. *Procedimiento*

Se aplica la sustancia problema formando una capa homogénea sobre la superficie de una placa de vidrio rugosa. Si se trata de un sólido, se humedece uniformemente la placa con una solución de la sustancia en un disolvente adecuado y se seca en una atmósfera inerte. Para la toma de medidas, la placa recubierta se cuelga en el analizador termogravimétrico y a continuación se mide continuamente la pérdida de peso en función del tiempo.

▼M1

La velocidad de evaporación $v_T$ a una temperatura dada se calcula a partir de la pérdida de peso Δm del portamuestras mediante la fórmula

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t}(gcm^{-2}h^{-1})$$

donde F es la superficie revestida de sustancia problema, que normalmente será la superficie del portamuestras, y t es el tiempo correspondiente a una pérdida de peso Δm.

La presión de vapor $p_T$ se calcula en función de la velocidad de evaporación $v_T$:

$$\text{Log } p_T = C + D \cdot \log v_T$$

donde C y D son constantes específicas del montaje experimental utilizado que dependen del diámetro del recinto de medida y del caudal del gas. Estas constantes deben determinarse de antemano midiendo un conjunto de compuestos cuya presión de vapor sea conocida y calculando la recta de regresión de log $p_T$ frente a log $v_T$ (11) (21) (22).

La relación entre la presión de vapor $p_T$ y la temperatura T en Kelvin viene dada por

$$\text{Log } p_T = A + B \cdot 1/T$$

donde A y B son constantes obtenidas calculando la recta de regresión de log $p_T$ frente a 1/T. Esta ecuación permite calcular por extrapolación la presión de vapor para cualquier otra temperatura.

1.5.7. **Método de saturación de gases (23)**

1.5.7.1. *Principio*

Se hace pasar un gas inerte, a temperatura ambiente y con un caudal conocido, a través o por encima de una muestra de sustancia problema, con lentitud suficiente para garantizar la saturación, ya que es esencial conseguir la saturación en la fase gaseosa. Se recoge la sustancia transportada, por regla general utilizando un sorbente, y se determina su cuantía. Como alternativa a la recogida de vapor y su análisis posterior, pueden utilizarse técnicas analíticas incorporadas en serie, como la cromatografía de gases, para determinar la cantidad de material transportada. La presión de vapor se calcula suponiendo que es aplicable la ley de los gases perfectos y que la presión total de una combinación de gases es igual a la suma de las presiones de los gases que la componen. La presión parcial de la sustancia problema, es decir, la presión de vapor, se calcula a partir del volumen total de gas conocido y del peso del material transportado.

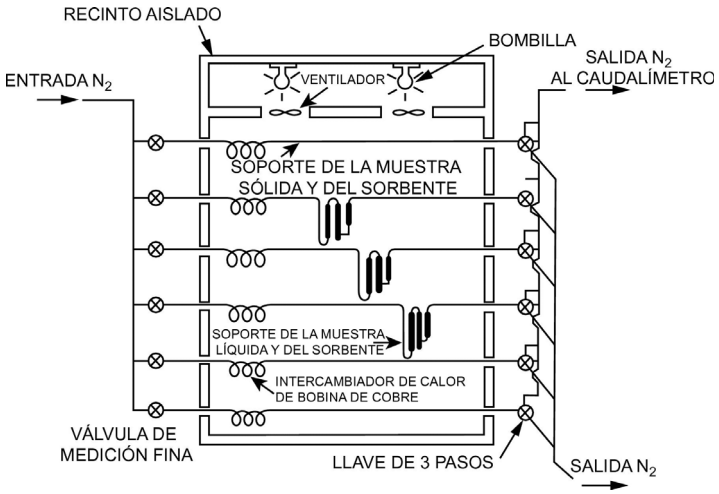
El procedimiento de saturación de gases, aplicable a sustancias sólidas o líquidas, puede utilizarse para presiones de vapor de un mínimo de $10^{-10}$ Pa (10) (11) (12) (13) (14). El método, no obstante, es más fiable para las presiones de vapor inferiores a $10^3$ Pa, ya que, por encima de este valor, suele arrojar resultados superiores a los reales, probablemente a causa de la formación de aerosoles. Dado que las medidas de la presión de vapor se toman a temperatura ambiente, no es necesario extrapolar los datos obtenidos a temperaturas más elevadas, evitándose así un proceso que a menudo genera errores graves.

1.5.7.2. *Aparato*

El procedimiento precisa del uso de un recinto a temperatura constante. El esquema de la figura 8 muestra un recinto con tres soportes para muestras líquidas y otros tantos para sólidas, que permiten realizar un triple análisis de una muestra líquida o sólida. La temperatura se controla con un margen máximo de ± 0,5 °C.

▼**M1**

*Figura 8*




En general se utiliza nitrógeno como gas inerte de arrastre, pero en ocasiones puede resultar necesario usar otro gas (24). El gas de arrastre debe estar seco. La corriente de gas se divide en seis subcorrientes controladas por válvulas de aguja (con orificio de aproximadamente 0,79 mm) y se introduce en el recinto mediante tubos de cobre de 3,8 mm de diámetro (d.i.) Tras equilibrar la temperatura, el gas fluye a través de la muestra y el colector de sorbente y sale del recinto.

Las muestras sólidas se cargan en tubos de vidrio de 5 mm de d.i. entre tapones de lana de vidrio (véase la figura 9). La figura 10 muestra un soporte para muestras líquidas y el sistema sorbente. El método más reproducible de medir la presión de vapor de un líquido es recubrir con él perlas de vidrio o un sorbente inerte tal como sílice y rellenar bien el soporte con estas bolas. Alternativamente, se puede hacer pasar el gas de arrastre por un filtro grosero de frita y hacer que borbotee a través de una columna de la sustancia problema líquida.

*Figura 9*

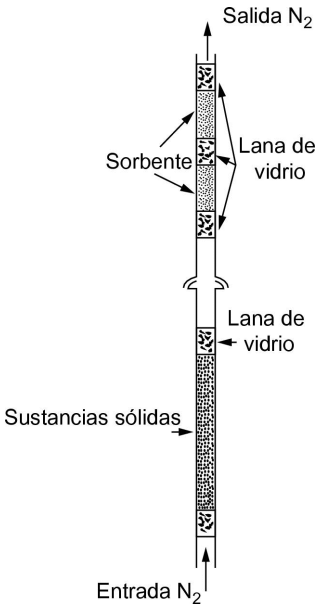
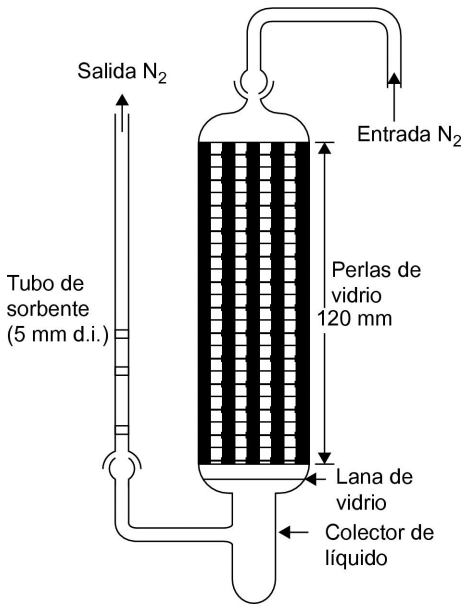



*Figura 10*



▼M1

El sistema sorbente contiene una sección frontal y otra de reserva. A presiones de vapor muy bajas, el sorbente retiene solamente cantidades muy pequeñas y la adsorción en la lana de vidrio y en los tubos de vidrio entre la muestra y el sorbente puede convertirse en un problema grave.

Otra manera eficiente de recoger el material vaporizado es el uso de colectores enfriados con $CO_2$ sólido. No inducen contrapresión en la columna del saturador y permiten una fácil retirada cuantitativa del material recogido.

1.5.7.3. *Procedimiento*

Se mide el caudal del gas de arrastre efluente a la temperatura ambiente. Debe comprobarse frecuentemente dicho caudal durante el experimento para garantizar que se dispone de un valor exacto del volumen total del gas de arrastre. Lo ideal es el seguimiento permanente con un caudalímetro de masa. La saturación de la fase gaseosa puede exigir un tiempo de contacto considerable y, en consecuencia, unos caudales de gas muy bajos (25).

Al concluir el experimento, se analizan separadamente las secciones de sorbente frontal y de reserva. Se procede a la desorción del compuesto en cada sección mediante la adición de un disolvente y se analizan cuantitativamente las soluciones resultantes para determinar el peso desorbido en cada una de ellas. El método analítico que se seleccione (así como el sorbente y el disolvente de desorción) dependerá de la naturaleza del material problema. La eficiencia de la desorción se determinará inyectando una cantidad conocida de muestra en el sorbente, desorbiéndola y analizando la cantidad recuperada. Es importante comprobar la eficiencia de la desorción a la concentración de la muestra en las condiciones de ensayo, o próxima a ella.

Para garantizar que el gas de arrastre esté saturado con la sustancia problema, se utilizarán tres caudales distintos. Si la presión de vapor calculada no muestra dependencia del caudal, se dará por supuesto que el gas está saturado.

La presión de vapor se calculará utilizando la ecuación:

$$p = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

donde:

p = presión de vapor (Pa)

W = masa de sustancia problema evaporada (g)

V = volumen de gas saturado ($m^3$)

R = constante universal de los gases 8,314 (J $mol^{-1}$ $K^{-1}$)

T = temperatura (K)

M = masa molar de la sustancia problema (g $mol^{-1}$)

Los volúmenes medidos deben corregirse para tener en cuenta las diferencias de presión y temperatura entre el caudalímetro y el saturador.

▼**M1**

1.5.8. **Rotor**

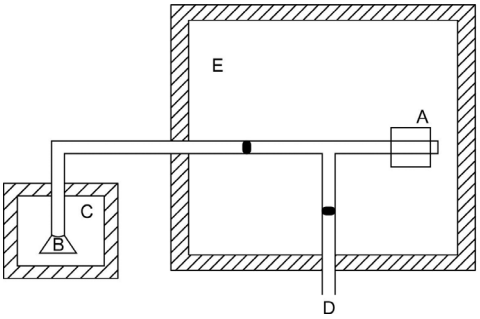
1.5.8.1. *Principio*

Este método utiliza un viscosímetro de rotor cuyo elemento medidor es una bolita de acero suspendida en un campo magnético que se hace girar mediante campos rotatorios (26) (27) (28). Unas bobinas de detección permiten medir la velocidad de giro. Cuando la bola alcanza una velocidad angular dada (generalmente, unas 400 revoluciones por segundo), se interrumpe la activación y se produce el frenado debido a la fricción con el gas. Se mide entonces el descenso de la velocidad angular en función del tiempo. La presión de vapor se deduce del frenado, dependiente de la presión, de la bola de acero. El intervalo recomendado es de $10^{-4}$ a 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Aparato*

En la figura 11 se muestra un esquema de montaje experimental. El cabezal de medida se coloca en un recinto termostatizado (regulado con una precisión de 0,1 °C) y el recipiente con la muestra se coloca en un recinto aparte, igualmente regulado con un margen de 0,1 °C. Todas las demás partes del montaje se mantienen a una temperatura superior con el fin de evitar la condensación. El conjunto del equipo se conecta a un sistema de alto vacío.

*Figura 11*




A: Cabezal de medida del rotor
B: Recipiente de la muestra
C: Termostato
D: Al vacío (turbobomba)
E: Termostato de aire

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. RESULTADOS

Cualquiera que sea el método elegido, la presión de vapor debe determinarse, al menos, a dos niveles de temperatura. Son preferibles tres niveles, o más, entre 0 y 50 °C, para comprobar la linealidad de la curva de la presión de vapor. En los casos del método de efusión (celda de Knudsen y termogravimetría isotérmica) y del método de saturación de gases, se recomienda 120 a 150 °C, en lugar de 0 a 50 °C, como intervalo de temperaturas de medición.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

— método utilizado,

▼**M1**

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas) y, en su caso, fase de purificación previa,

— al menos dos valores de presión de vapor y temperatura —y preferiblemente tres o más— en el intervalo comprendido entre 0 y 50 °C (o entre 120 y 150 °C),

— al menos una de las temperaturas debe ser igual o inferior a 25 °C, si técnicamente lo permite el método elegido,

— todos los datos originales,

— una gráfica de log p frente a 1/T,

— una estimación de la presión de vapor a 20 o 25 °C.

En caso de transición (cambio de estado, descomposición), hay que incluir:

— naturaleza del cambio,

— temperatura a la que se produce a la presión atmosférica,

— presión de vapor a 10 y a 20 °C por debajo de la temperatura de transición, así como a 10 y 20 °C por encima de dicha temperatura (excepto en el caso de transición del estado sólido al estado gaseoso).

Deben incluirse todas las informaciones y observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

3. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L 383 A, 26-47 (1992).

(2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.

(3) Weissberger, R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.

(4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.

(5) NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from $10^{-1}$ to $10^{5}$ Pa — Static method.

(6) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure — Temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.

(7) NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from $10^{-3}$ to 1 Pa — Vapour pressure balance method.

▼**M1**

(8) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.

(9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.

(10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000). Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.

(11) Tomlin, C.D.S. (ed.), The Pesticide Manual, Twelfth Edition (2000).

(12) Friedrich, K., Stammbach, K., Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16 (1964), 22-28.

(13) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A., Pesticide Science 16 (1982), 269-278.

(14) Rordorf, B.F., Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty-nine halogenated dibenzo-p-dioxins, Thermochimia Acta 112 Issue 1 (1987), 117-122.

(15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4 (1973) 137-147.

(16) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5 (1974) 393-400.

(17) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G., A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13 (1982), 161-168.

(18) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45 (1995), 27-31.

(19) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A., Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science, 53 (1998) 300-310.

(20) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H., A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12) (1998), 1512-20.

(21) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81th ed.(2000), Vapour Pressure in the Range – 25 °C to 150 °C.

(22) Meister, R.T. (ed.), Farm Chemicals Handbook, vol. 88 (2002).

(23) 40 CFR, 796 (1993), pp. 148-153, Office of the Federal Register, Washington DC.

▼**M1**

(24) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.

(25) Westcott *et al*. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.

(26) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.

(27) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.

(28) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

▼M1

*Apéndice*

**Método de estimación**

INTRODUCCIÓN

Los valores estimados de la presión de vapor pueden utilizarse:

— para decidir cuál de los métodos experimentales es el adecuado,

— para dar una estimación o un valor límite en casos en que los métodos experimentales no puedan aplicarse por causas técnicas.

MÉTODO DE ESTIMACIÓN

La presión de vapor de las sustancias líquidas y sólidas puede estimarse utilizando la correlación de Watson modificada (a). El único dato experimental necesario es el punto de ebullición normal y el método es aplicable en el intervalo de presiones comprendido entre $10^5$ y $10^{-5}$ Pa.

Se encontrará información detallada sobre este método en el «Handbook of Chemical Property Estimation Methods» (b). Véase igualmente OECD Environmental Monograph No.67 (c).

PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO

La presión de vapor se calcula mediante la fórmula:

$$\ln P_{vp} \approx \frac{\Delta H_{vp}}{\Delta\, Z_b R T_b}\left[1 - \frac{\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2\,m\left(3 - 2\frac{T}{T_b}\right)^{m-1} \ln\frac{T}{T_b}\right]$$

donde:

T = temperatura correspondiente

$T_b$ = punto normal de ebullición

$P_{vp}$ = presión de vapor a la temperatura T

$\Delta H_{vb}$ = calor de vaporización

$\Delta Z_b$ = factor de compresibilidad (estimado en 0,97)

m = factor empírico que depende del estado físico a la temperatura correspondiente

Además,

$$\frac{\Delta H_{vp}}{T_b} = K_F\,(8{,}75 + R \ln T_b)$$

donde $K_F$ es un factor empírico que tiene en cuenta la polaridad de la sustancia. La referencia (b) contiene los factores $K_F$ de varios tipos de compuestos.

▼**M1**

Es frecuente disponer de datos en los que figura un punto de ebullición a presión reducida. En estos casos, la presión de vapor se calcula mediante la fórmula:

$$\ln P_{vp} \approx \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1}\left[1 - \left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^m \frac{T_1}{T} - 2\,m\left(3 - 2\frac{T}{T_1}\right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1}\right]$$

donde $T_1$ es el punto de ebullición a la presión reducida $P_1$.

INFORME

Cuando se aplique el método de estimación, el informe incluirá una documentación completa de los cálculos.

BIBLIOGRAFÍA

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No. 67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

## A.5. TENSIÓN SUPERFICIAL

### 1. MÉTODO

Los métodos descritos se basan en las líneas directrices de la OCDE (1). Los principios fundamentales se dan en la referencia (2).

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos descritos se aplican a la medida de la tensión superficial de las soluciones acuosas.

Antes de efectuar el ensayo, es conveniente disponer de información preliminar sobre la solubilidad en el agua, la estructura, las propiedades de hidrólisis y la concentración crítica para la formación de micelas de la sustancia.

Los siguientes métodos son aplicables a la mayor parte de las sustancias químicas, cualquiera que sea su grado de pureza.

Las medidas de la tensión superficial por el método del tensiómetro de anillo se limita a las soluciones acuosas con una viscosidad dinámica inferior a 200 mPa s, aproximadamente.

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La entalpia de superficie libre por unidad de superficie constituye la tensión superficial.

Esta última se expresa en:

N/m (en unidades SI) o

mN/m (en subunidades SI)

1 N/m = $10^3$ dinas/cm

1 mN/m = 1 dina/cm en el sistema CGS (en desuso).

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se estudie una sustancia nueva. Se deben utilizar esencialmente para comprobar la validez del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

En las referencias (1) y (3) se señalan sustancias de referencia que cubren una amplia gama de tensiones superficiales.

#### 1.4. PRINCIPIOS DE LOS MÉTODOS

Los métodos se basan en la medida de la fuerza máxima que es preciso ejercer verticalmente sobre una brida o anillo en contacto con la superficie del líquido estudiado, colocado en un recipiente adecuado, a fin de separarlo de dicha superficie, o sobre una placa, uno de cuyos bordes esté en contacto con la superficie, a fin de elevar la película formada.

Las sustancias que sean hidrosolubles al menos a la concentración de 1 mg/l se someterán al ensayo en solución acuosa a una sola concentración.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La precisión de los métodos descritos es mayor de la que normalmente se requiere en la evaluación del riesgo para el medio ambiente.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

Se prepara una solución de la sustancia en agua destilada. La concentración de esta solución debe ser el 90 % de la concentración de saturación de la sustancia en agua; si esta concentración es superior a 1 g/1, se utilizará para el ensayo la concentración de 1 g/1. Las sustancias cuya solubilidad en agua es inferior a 1 mg/1 no tienen que someterse al ensayo.

1.6.1. **Método de la placa**

Véase ISO 304 y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.2. **Método de la brida**

Véase ISO 304 y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.3. **Método del anillo**

Véase ISO 304y NF T 73-060 (Tensioactivos: determinación de la tensión superficial por elevación de películas líquidas).

1.6.4. **Método de) anillo armonizado por la OCDE**

1.6.4.1. *Aparato*

Para efectuar esta medida pueden emplearse tensiómetros comerciales. Constan de los elementos siguientes:

— un portamuestras móvil,

— un dinamómetro,

— un cuerpo de medida (anillo),

— un recipiente de medida.1.6.4.1.1.

1.6.4.1.1. Portamuestras móvil

El portamuestras móvil sirve de soporte al recipiente de medida termostatizado, que contiene el líquido problema. Va montado en la misma peana que el dinamómetro.

1.6.4.1.2. Dinamómetro

El dinamómetro (véase la figura) va colocado por encima del portamuestras. El error en la medida de la fuerza no debe pasar de $\pm 10^{-6}$ N, lo que equivale a un límite de error de ± 0,1 mg en una medida de masa. En la mayoría de los casos, la escala de medidas de los tensiómetros vendidos en el mercado está calibrada en mN/m, de manera que se puede leer directamente la tensión superficial en mN/m con una precisión de 0,1 mN/m.

▼B

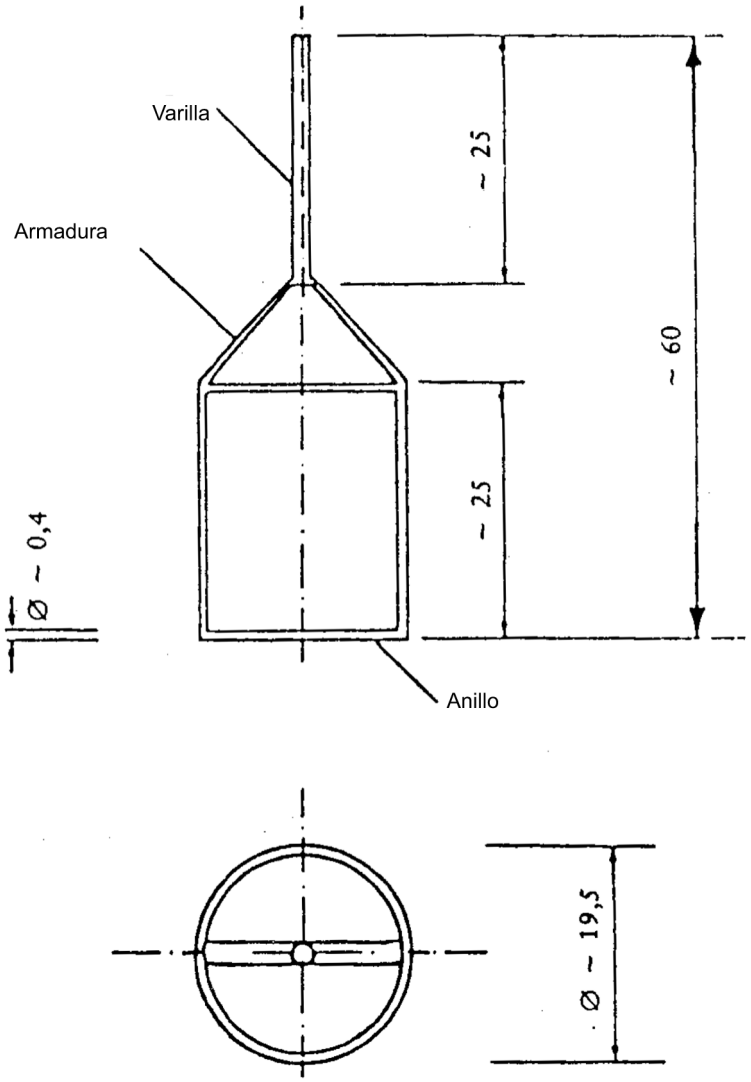
1.6.4.1.3. Cuerpo de medida (anillo)

El anillo suele estar formado por un hilo de platino-iridio de 0,4 mm de grosor, aproximadamente, y una circunferencia media de 60 mm. Dicho anillo está suspendido horizontalmente de una armadura que va unida por una varilla metálica al dinamómetro (véase la figura).

*Figura*

**Cuerpo de medida**

(todas las dimensiones se expresan en milímetros)




1.6.4.1.4. Recipiente de medida

El recipiente de medida que contiene la solución problema debe ser un recipiente de vidrio termostatizado. Debe estar diseñado de manera que, durante la determinación, la temperatura del líquido y de la fase gaseosa por encima de su superficie se mantenga constante y no haya evaporación. Los recipientes cilíndricos de vidrio de un diámetro interior de, al menos, 45 mm cumplen estos requisitos.

▼B

1.6.4.2. *Preparación del aparato*

1.6.4.2.1. Limpieza

Los recipientes de vidrio deben limpiarse con cuidado. Si es necesario se lavarán con mezcla sulfocrómica caliente y, a continuación, con ácido fosfórico viscoso (83 a 98 % en peso de $H_3PO_4$); se enjuagarán abundantemente con agua corriente y luego con agua bidestilada hasta el momento en que se obtenga reacción neutra; finalmente, se secarán o bien se enjuagarán con parte del líquido que se va a medir.

El anillo se limpiará con abundante agua para eliminar todos los restos de sustancias solubles en agua, se sumergerá unos segundos en mezcla sulfocrómica, se enjuagará con agua bidestilada hasta que se obtenga reacción neutra y, finalmente, se secará rápidamente sobre una llama de metanol.

*Nota:*

Los restos de sustancias que no se disuelvan ni se destruyan con la mezcla sulfocrómica ni con el ácido fosfórico, como las siliconas, deberán ser eliminadas con un disolvente orgánico apropiado.

1.6.4.2.2. Calibrado del aparato

La validación del aparato consiste en comprobar el punto cero y en ajustarlo de tal manera que la indicación dada por el aparato permita una determinación fiable en mN/m.

*Montaje:*

Se nivelará el aparato, por ejemplo con un nivel de burbuja colocado sobre la peana y con tornillos de nivelación.

*Ajuste del punto cero:*

Después de montar el anillo en el aparato y antes de sumergirlo en el líquido, debe ajustarse a cero el indicador del tensiómetro y comprobarse el paralelismo del anillo con la superficie del líquido. A tal fin, puede utilizarse la superficie del líquido como espejo.

*Calibrado:*

El calibrado en sí del aparato puede hacerse con uno de los dos métodos siguientes:

a) con una masa: este procedimiento consiste en utilizar cumiapesos de masa conocida (entre 0,1 g y 1,0 g), que se colocan sobre el anillo. El factor de calibrado $\Phi_a$, por el que habrá que multiplicar todas las lecturas del instrumento, se determina mediante la ecuación (1):

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \qquad (1)$$

donde

$$\sigma_r = \frac{mg}{2b} \text{ (mN/m)}$$

m = masa del contrapeso (g)

g = aceleración de la gravedad (981 cm.s-2 a nivel del mar)

b = circunferencia media del anillo (cm)

$_{Ea}$ = lectura del tensiómetro tras colocación del contrapeso sobre el anillo (mN/m);

▼B

b) con agua: este procedimiento utiliza agua pura cuya tensión superficial, por ejemplo a 23 °C, es igual a 72,3 mN/m. Es más rápido que el sistema anterior, pero siempre existe el riesgo de que ¡a tensión superficial del agua se vea modificada por restos de tensioactivos.

El factor de calibrado$\Phi_b$, por el que habrá que multiplicar todas las lecturas del aparato, se determina mediante la ecuación siguiente (2);

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \qquad (2)$$

donde

$\sigma_0$ = valor dado en la bibliografía para la tensión superficial del agua (mN/m) a la temperatura elegida para el ensayo

$\sigma_g$ = valor medido de la tensión superficial de¡ agua (mN/m) a esa misma temperatura.

1.6.4.3. *Preparación de la muestra*

Las soluciones acuosas de la sustancia se prepararán teniendo en cuenta las concentraciones exigidas. Es imprescindible que la disolución de la sustancia sea completa.

La solución así preparada debe mantenerse a una temperatura constante (± 0,5 °C). Dado que la tensión superficial de una solución colocada en el recipiente de medida se modifica después de cierto tiempo, deben efectuarse varias medidas en momentos diferentes y hay que trazar una curva de la tensión superficial en función del tiempo. Cuando ya no haya modificaciones, se habrá alcanzado un estado de equilibrio.

El polvo o los vapores de otras sustancias falsean la medida. La operación debe realizarse bajo una campana de protección.

1.6.5. **Condiciones del ensayo**

Las medidas deben efectuarse a una temperatura de unos 20 °C, sin variaciones de temperatura superiores a ± 0,5 °C.

1.6.6. **Desarrollo del ensayo**

Se vierte en el recipiente de medida, cuidadosamente limpio, la solución que se desea medir, procurando evitar la formación de burbujas y, a continuación, se coloca el recipiente de medida en el portamuestras, elevándolo hasta que el anillo quede sumergido bajo la superficie de la solución. Entonces se vuelve a bajar gradual y uniformemente (a una velocidad de unos 0,5 cm/min) el portamuestras para separar ei anillo de la superficie hasta llegar a la fuerza máxima. La capa de líquido adherida al anillo no debe desprenderse de este. Una vez acabada la medida, se sumerge de nuevo el anillo y se repiten las medidas hasta que se obtenga un valor de tensión superficial constante. En cada determinación se anotará el tiempo que haya transcurrido desde la transferencia de la solución al recipiente de medida. Las lecturas deben registrarse en el valor máximo de la fuerza necesaria para retirar el anillo de la superficie del líquido.

▼B

2. **RESULTADOS**

Para calcular la tensión superficial se multiplicará primero el valor leído en el aparato en mN/m por el factor de calibrado $\Phi_a$ o $\Phi_b$ (según el procedimiento de calibrado utilizado). Se obtendrá entonces un valor solo aproximadoque, a continuación, deberá corregirse.

Harkins y Jordán (4) han establecido de manera empírica factores de corrección para los valores de tensión superficial obtenidos por el método del anillo, que dependen de las dimensiones del anillo, de la densidad del líquido y de su tensión superficial.

Dada la laboriosidad del proceso de determinación del factor de corrección para cada medida a partir de las tablas de Harkins y Jordán, en las soluciones acuosas se admite la utilización de un procedimiento simplificado de lectura de la tensión superficial tomando directamente los valores corregidos de la tabla siguiente (se recurrirá a la interpolación en las lecturas que se sitúen entre dos valores de la tabla).

*Tabla*

**Corrección de los valores medidos de la tensión superficial**

Válido solamente para las soluciones acuosas p = 1 g/cm$^3$

| | |
|---|---|
| R | = 9,55 mm (radio medio del anillo) |
| r | = 0,185 mm (radio del hilo que constituye el anillo) |

| Valor experimental (mN/m) | Valor corregido (mN/m) | |
|---|---|---|
| | Calibrado con contrapeso [véase el punto 1.6.4.2.2.(a)] | Calibrado con agua [véase el punto 1.6.4.2.2.(b)] |
| 20 | 16,9 | 18,1 |
| 22 | 18,7 | 20,1 |
| 24 | 20,6 | 22,1 |
| 26 | 22,4 | 24,1 |
| 28 | 24,3 | 26,1 |
| 30 | 26,2 | 28,1 |
| 32 | 28,1 | 30,1 |
| 34 | 29,9 | 32,1 |
| 36 | 31,8 | 34,1 |
| 38 | 33,7 | 36,1 |
| 40 | 35,6 | 38,2 |
| .42 | 37,6 | 40,3 |
| 44 | 39,5 | 42,3 |
| 46 | 41,4 | 44,4 |
| 48 | 43,4 | 46,5 |
| 50 | 45,3 | 48,6 |
| 52 | 47,3 | 50,7 |
| 54 | 49,3 | 52,8 |
| 56 | 51,2 | 54,9 |

▼B

| Valor experimental (mN/m) | Valor corregido (mN/m) | |
|---|---|---|
| | Calibrado con contrapeso [véase el punto 1.6.4.2.2.(a)] | Calibrado con agua [véase el punto 1.6.4.2.2.(b)] |
| 58 | 53,2 | 57,0 |
| 60 | 55,2 | 59,1 |
| 62 | 57,2 | 61,3 |
| 64 | 59,2 | 63,4 |
| 66 | 61,2 | 65,5 |
| 68 | 63,2 | 67,7 |
| 70 | 65,2 | 69,9 |
| 72 | 67,2 | 72,0 |
| 74 | 69,2 | — |
| 76 | 71,2 | — |
| 78 | 73,2 | — |

Esta tabla se ha elaborado a partir de la corrección de Harkins Jordan, y es similar a la de la norma DIN (DIN 53914) para agua y soluciones acuosas (densidad p = 1 g/cm$^3$); se utiliza con un anillo existente en el mercado cuyas dimensiones son R = 9,55 mm (radio medio del anillo) y r = 0,185 mm (radio del hilo que constituye el anillo). La tabla da los valores corregidos de las medidas de tensión superficial efectuadas tras un calibrado con contrapesos o con agua.

Otra posibilidad, sin calibrado previo, consiste en calcular la tensión superficial por medio de la fórmula siguiente:

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

donde

F = fuerza medida en el dinamómetro en el punto de ruptura de la película

R = radio del anillo

f = factor de corrección (1).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEI ENSAYO

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

— método utilizado,

— tipo de agua o de solución utilizada,

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— resultados de las medidas: tensión superficial (leída) incluyendo a la vez las diferentes lecturas y su medida aritmética, así como el valor medio corregido (teniendo en cuenta el factor específico del equipo y la tabla de corrección),

▼B

— concentración de la solución,

— temperatura del ensayo,

— tiempo de la solución empleada; en particular, el tiempo transcurrido entre la preparación de la solución y su medida,

— evolución de la tensión superficial de la solución con el tiempo a partir del momento en que se haya transferido al recipiente de medida,

— deben señalarse todas las informaciones y observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, especialmente lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dado que el agua destilada tiene una tensión superficial de 72,75 mN/m a 20 °C, se considerarán sustancias tensioactivas aquellas que presenten una tensión superficial inferior a 60 mN/m en las condiciones de este método.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 115, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) R. Weissberger ed., Technique of Organic Chemistry, Chapter XIV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed. Interscience Publ., Nueva York, 1959, vol. I, Part I.

(3) Pure Appl. Chem., 1976, Vol. 48, 511

(4) Harlcins, W.D., Jordan, H.F., J. Amer. Chem. Soc, 1930, Vol. 52, 1751.

▼M4

## A.6. **HIDROSOLUBILIDAD**

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 105 de la OCDE (1995). Es una versión revisada de las TG 105 original que se adoptaron en 1981. No hay diferencias esenciales entre la versión actual y la de 1981. Se ha modificado fundamentalmente el formato. La revisión está basada en el método de ensayo de la UE "Hidrosolubilidad" ([1]).

### CONSIDERACIONES INICIALES

2. La hidrosolubilidad de una sustancia puede verse considerablemente afectada por la presencia de impurezas. El presente método se dirige a determinar la hidrosolubilidad de sustancias esencialmente puras que son estables en agua y no volátiles. Antes de proceder al ensayo, es conveniente disponer de información sobre la sustancia problema, como la fórmula estructural, la presión de vapor, la constante de disociación y la hidrólisis como función del pH.

3. En el presente documento se describen dos métodos de ensayo, el método de elución en columna y el método del frasco, que abarcan respectivamente solubilidades por debajo y por encima de $10^{-2}$ g/l. Se describe además un ensayo preliminar sencillo. Este permite determinar aproximadamente la cantidad adecuada de muestra que deberá emplearse en el ensayo final, así como el tiempo necesario para conseguir la saturación.

### DEFINICIONES Y UNIDADES

4. La hidrosolubilidad de una sustancia es la concentración de saturación en masa de la sustancia en el agua a una temperatura determinada.

5. Se expresa en masa de soluto por volumen de solución. La unidad SI es el $kg/m^3$, pero se puede utilizar también g/l.

### SUSTANCIAS DE REFERENCIA

6. No es necesario emplear sustancias de referencia cada vez que se analice una sustancia problema.

### DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

**Condiciones del ensayo**

7. El ensayo debe efectuarse, a ser posible, a 20 °C ± 0,5 °C. La temperatura elegida se mantendrá constante en todas las partes importantes del equipo.

**Ensayo preliminar**

8. De manera gradual, añadir volúmenes crecientes de agua a temperatura ambiente a alrededor de 0,1 g de muestra (las sustancias sólidas deben estar reducidas a polvo) en una probeta de 10 ml con tapón de vidrio. Después de la adición de cada cantidad de agua, agitar vigorosamente la mezcla durante 10 minutos y luego comprobar visualmente si contiene partículas de muestra no disueltas. Si después de añadir 10 ml de agua la muestra o determinadas partes de esta no se han disuelto, hay que proseguir el experimento en una probeta de 100 ml. La solubilidad aproximada se indica, en el cuadro 1, bajo

▼M4

el volumen de agua en que se efectúa la disolución completa de la muestra. Cuando la solubilidad es baja, puede hacer falta mucho tiempo para que se disuelva la sustancia problema, por lo que habrá que esperar como mínimo 24 horas. Si al cabo de 24 horas la sustancia problema sigue sin disolverse, hay que dejar más tiempo (96 horas como máximo) o bien proceder a una nueva dilución a fin de determinar si hay que utilizar el método de elución en columna o el método del frasco.

*Cuadro 1*

| ml de agua en que se disuelven 0,1 g de soluto | 0,1 | 0,5 | 1 | 2 | 10 | 100 | > 100 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Solubilidad aproximada en g/l | < 1 000 | 1 000-200 | 200-100 | 100-50 | 50-10 | 10-1 | < 1 |

**Método de elución en columna**

*Principio*

9. Este método se basa en la elución con agua de la sustancia problema en una microcolumna cargada con un material soporte inerte previamente cubierto con un exceso de sustancia problema (2). La hidrosolubilidad viene determinada por la concentración en masa del eluato cuando ha alcanzado una meseta en función del tiempo.

*Aparato*

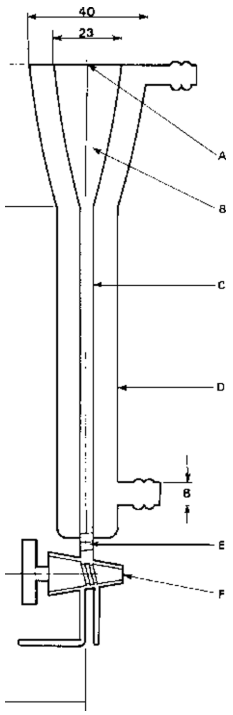
10. El aparato consiste en una microcolumna (figura 1) que se mantiene a temperatura constante. Está conectado a una bomba de recirculación (figura 2) o a un recipiente de nivelación (figura 3). La microcolumna contiene un soporte inerte retenido por un pequeño tapón de lana de vidrio que servirá también para separar las partículas por filtración. Como soporte se pueden emplear bolas de cristal, tierra de diatomeas u otros materiales inertes.

11. La microcolumna representada en la figura 1 es idónea para funcionar con una bomba de recirculación. Tiene un espacio de cabeza correspondiente a cinco volúmenes de lecho de agua (desechados al principio del ensayo) y una capacidad para cinco muestras (tomadas para análisis durante el ensayo). No obstante, se puede reducir la dimensión si es posible añadir agua al sistema durante el ensayo para reemplazar los cinco volúmenes de lecho iniciales, eliminados con las impurezas. La columna se conectará mediante tubos de material inerte a la bomba de recirculación, que será capaz de suministrar aproximadamente 25 ml/hora. Como bomba de recirculación se podrá utilizar, por ejemplo, una bomba peristáltica o una bomba de membrana. Hay que procurar que el material del tubo no sea causa de contaminación ni adsorción.

12. En la figura 3 se muestra el esquema de un sistema con recipiente de nivelación. En este sistema la microcolumna lleva acoplada una llave de una vía. La conexión al recipiente de nivelación se hace mediante una junta de vidrio esmerilado y tubos de material inerte. El caudal del recipiente de nivelación deberá ser de unos 25 ml/hora.

▼**M4**

*Figura 1*




Dimensiones en mm

A. Conexión para la junta de vidrio esmerilado

B. Espacio de cabeza

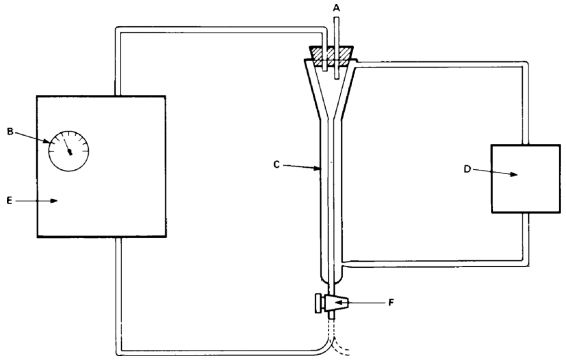
C. Diámetro interior 5

D. Diámetro exterior 19

E. Tapón de lana de vidrio

F. Llave

*Figura 2*




A. Equilibrio con la atmósfera

B. Caudalímetro

C. Microcolumna

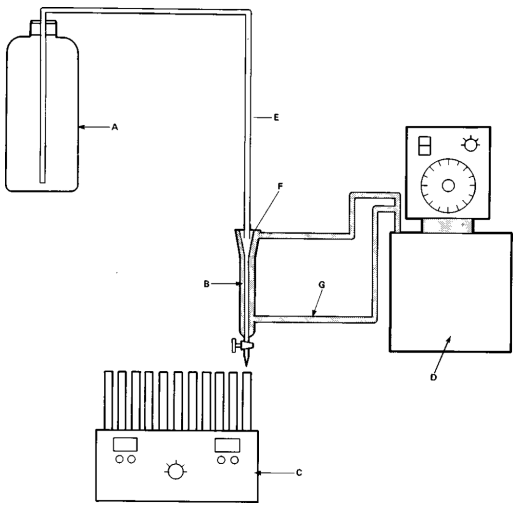
D. Bomba de circulación termostatizada

E. Bomba de recirculación

F. Llave de dos vías para la toma de muestras

▼**M4**

*Figura 3*




A. Recipiente de nivelación (por ejemplo, frasco de 2,5 litros)

B. Columna

C. Acumulador de fracciones

D. Termostato

E. Tubo de teflón

F. Junta de vidrio esmerilado

G. Tubo para la circulación de agua entre el termostato y la columna, con un diámetro interior de aproximadamente 8 mm

13. Pesar unos 600 mg de material soporte y pasarlos a un matraz de fondo redondo de 50 ml. Disolver una cantidad idónea de la sustancia problema en un disolvente volátil con calidad de reactivo analítico y añadir al soporte una cantidad adecuada de esta solución. El disolvente debe evaporarse por completo, por ejemplo en un rotavapor; de lo contrario, no se daría la saturación en agua del soporte durante la etapa de elución, debido al efecto de partición en la superficie. Dejar que se empape el soporte cargado de esta forma durante 2 horas en 5 ml de agua, aproximadamente, y luego pasar la suspensión a la microcolumna. También se podrá verter el soporte cargado seco en la microcolumna llena de agua y a continuación equilibrar después durante 2 horas.

14. La carga del soporte puede plantear dificultades que lleven a resultados erróneos, por ejemplo si la sustancia problema se deposita en forma de aceite. Las dificultades deben examinarse y han de recogerse los datos correspondientes.

*Procedimiento empleado con una bomba de recirculación*

15. Se inicia la circulación a través de la columna. El caudal recomendado es de 25 ml/hora, aproximadamente, que equivale a unos 10 volúmenes de lecho por hora para la columna arriba descrita. Se descartan como mínimo los 5 primeros volúmenes de lecho a fin de eliminar las impurezas solubles en el agua. Luego se conecta la bomba de recirculación, haciendo funcionar el aparato hasta llegar al estado de equilibrio, definido por 5 muestras sucesivas cuyas concentraciones no difieran de forma aleatoria en más del ± 30 %. Dichas muestras deben estar separadas entre sí por un intervalo de tiempo correspondiente al paso de al menos 10 volúmenes de lecho. Dependiendo del método analítico aplicado, puede ser preferible establecer una curva de concentración/tiempo para comprobar que se ha alcanzado el equilibrio.

▼M4

*Procedimiento empleado con un recipiente de nivelación*

16. Se recogerán las sucesivas fracciones de eluato y se analizarán según el método elegido. Para determinar la hidrosolubilidad, se utilizarán las fracciones procedentes del intervalo medio de elución cuyas concentraciones sean constantes en el intervalo de ± 30 %, al menos en 5 fracciones consecutivas.

17. Como eluyente se recomienda usar agua bidestilada. También puede usarse agua desionizada con una resistividad superior a 10 megaohms/cm y un contenido de carbono orgánico total menor del 0,01 %.

18. Con ambos procedimientos se repetirá la operación, reduciendo el caudal a la mitad. Si los resultados de las dos operaciones concuerdan, la prueba es satisfactoria. Si se observa una solubilidad aparente más elevada con el caudal inferior, se continuará con la reducción del caudal a la mitad hasta que se obtenga la misma solubilidad en dos operaciones sucesivas.

19. Con ambos procedimientos se debe controlar la posible presencia de materia coloidal en las fracciones estudiando la aparición del efecto Tyndall. La presencia de partículas invalida el ensayo, y este deberá repetirse después de mejorar la eficacia de la filtración de la columna.

20. Se medirá el pH de cada muestra, preferiblemente con ayuda de tiras indicadoras específicas.

**Método del frasco**

*Principio*

21. La sustancia problema (los sólidos deben estar pulverizados) se disuelve en agua a una temperatura algo superior a la temperatura de ensayo. Cuando se alcanza la saturación, se deja enfriar la mezcla y se mantiene a la temperatura de ensayo. Otra posibilidad es realizar la medida directamente a la temperatura de ensayo siempre que, mediante un muestreo adecuado, se garantice que se ha alcanzado el equilibrio de saturación. Luego, se determina con un método analítico apropiado la concentración en masa de la sustancia problema en la solución acuosa, que no debe contener ninguna partícula sin disolver (3).

*Aparato*

22. Se necesita el siguiente instrumental:

— material de vidrio e instrumentos de laboratorio normales,

— un dispositivo para agitar las disoluciones a temperatura constante controlada,

— si se precisa en el caso de las emulsiones, una centrífuga (preferiblemente termostatizada), y

— equipo analítico.

*Procedimiento*

23. Evaluar, a partir del ensayo preliminar, la cantidad de sustancia problema necesaria para saturar el volumen de agua elegido. Pesar aproximadamente cinco veces dicha cantidad en cada uno de tres recipientes de vidrio con tapón, también de vidrio (por ejemplo, tubos de centrífuga, matraces). Añadir a cada recipiente un volumen de agua determinado en función del método analítico y del intervalo de solubilidad. Los frascos se tapan firmemente y se agitan después a 30 °C. Utilizar un dispositivo agitador o mezclador que pueda actuar a temperatura constante como, por ejemplo, un agitador magnético en baño de agua termostatizado. Un día después, tomar uno de los recipientes y equilibrar durante 24 horas a la temperatura del ensayo, agitando de vez en cuando. El contenido del recipiente se centrifuga luego a la temperatura del ensayo y se determina la concentración de la sustancia problema en la fase acuosa clara utilizando un método analítico adecuado. Los otros dos recipientes se tratan de la misma manera, después de un primer

▼M4

equilibrado a 30 °C durante dos y tres días, respectivamente. Si las concentraciones medidas en al menos los dos últimos recipientes no difieren en más del 15 %, la prueba es satisfactoria. Si los resultados de los recipientes 1, 2 y 3 acusan una tendencia a la progresión, repetir de nuevo todo el ensayo utilizando tiempos de equilibrado más largos.

24. El ensayo se puede realizar también sin preincubar a 30 °C. Para evaluar la velocidad de adquisición del equilibrio de saturación se irán tomando muestras hasta que el tiempo de agitación deje de influir en las concentraciones medidas.

25. Se medirá el pH de cada muestra, preferiblemente con ayuda de tiras indicadoras específicas.

**Determinaciones analíticas**

26. Es preferible utilizar un método específico de la sustancia, pues pequeñas cantidades de impurezas solubles pueden originar errores sensibles en la solubilidad medida. Pueden citarse como ejemplos los siguientes métodos: cromatografía de gases o de líquidos, valoración volumétrica, fotometría y voltametría.

DATOS E INFORME

**Datos**

*Método de elución en columna*

27. En cada operación debe calcularse el valor medio y la desviación típica de al menos cinco muestras consecutivas tomadas durante la meseta de saturación. Los valores medios obtenidos en dos ensayos con caudales diferentes no deberán diferir en más del 30 %.

*Método del frasco*

28. A partir de los resultados de cada uno de los tres recipientes, que no deberán diferir en más del 15 %, se calcularán las medias.

**Informe del ensayo**

*Método de elución en columna*

29. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

— resultados del ensayo preliminar,

— identidad química e impurezas (etapa de purificación preliminar, en su caso),

— concentraciones individuales, caudales y pH de cada muestra,

— desviación típica y media de al menos cinco muestras tomadas durante la meseta de saturación de cada operación,

— promedio de al menos dos operaciones sucesivas,

— temperatura del agua durante el proceso de saturación,

— método de análisis,

— naturaleza del material de soporte,

— carga del material de soporte,

— disolvente utilizado,

— cualquier signo de inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo,

— todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia problema.

▼**M4**

*Método del frasco*

30. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

— resultados del ensayo preliminar,

— identidad química e impurezas (etapa de purificación preliminar, en su caso),

— resultados analíticos individuales y su media cuando se determine más de un valor para un mismo recipiente,

— pH de cada muestra,

— media de los valores de los diferentes recipientes cuando concuerden,

— temperatura del ensayo,

— método analítico,

— cualquier signo de inestabilidad química de la sustancia durante el ensayo,

— todas las observaciones útiles para la interpretación de los resultados, en particular lo referente a las impurezas y al estado físico de la sustancia problema.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Directiva 92/69/CEE de la Comisión, de 31 de Julio de 1992, por la que se adapta al progreso técnico, por decimoséptima vez, la Directiva 67/548/CEE del Consejo, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas (DO L 383 de 29.12.1992, p. 113).

(2) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility — Column elution method.

(3) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use — Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility — Flask method.

▼B

## A.8. COEFICIENTE DE REPARTO

### 1. MÉTODO

El método de frasco de agitación se basa en las líneas directrices de la OCDE (1).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de información preliminar sobre la fórmula desarrollada, la constante de disociación, la hidrosolubilidad, la hidrólisis, la solubilidad en n-octanol y la tensión superficial de la sustancia antes de proceder al ensayo.

Las medidas relativas a sustancias ionizables deben hacerse solo con la forma no ionizada (ácido libre o base libre) obtenida mediante el uso de una solución amortiguadora con un pH que esté al menos una unidad de pH por debajo (ácido libre) o por encima (base libre) del pK.

Este método de ensayo incluye dos procedimientos distintos: el método de frasco de agitación y la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). El primero puede aplicarse cuando el valor de log $P_{ow}$ (véanse más abajo las definiciones) está en el intervalo de -2 a 4, y el segundo cuando está en el intervalo de 0 a 6. Antes de llevar a cabo ninguno de los procedimientos experimentales es necesario obtener una estimación previa del coeficiente de reparto.

El método de frasco de agitación es aplicable solo a sustancias esencialmente puras solubles en agua y n-octanol, y no es aplicable a productos tensoactivos (para los que debe darse su valor calculado o una estimación basada en las solubilidades en n-octanol y agua por separado).

El método de CLAR no puede aplicarse a ácidos o bases fuertes, complejos metálicos, materiales tensoactivos ni sustancias que reaccionen con el eluyente. Para estos materiales debe darse un valor calculado o una estimación basada en las solubilidades en n-octanol y agua por separado.

El método de CLAR es menos sensible a la presencia de impurezas en el compuesto problema que el método de frasco de agitación. Sin embargo, las impurezas pueden hacer en algunos casos que la interpretación de los resultados sea difícil porque la atribución de los picos resulte dudosa. En el caso de mezclas que den una banda sin resolución, hay que establecer los límites superior e inferior de log P.

### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El coeficiente de reparto (P) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio ($c_i$) de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes considerablemente inmiscibles. En el caso del n-octanol y del agua:

$$p_{ow} = \frac{c_n - \text{octanol}}{c_{water}}$$

El coeficiente de reparto (P) es, pues, el cociente de dos concentraciones; se indica generalmente en forma de su logaritmo decimal (log P).

▼B

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

*Método de frasco de agitación*

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se investiga una nueva sustancia. Deben servir esencialmente para comprobar de vez en cuando la eficacia del método y para comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

*Método de CLAR*

Con el fin de relacionar los datos medidos según la CLAR de un compuesto con su P, hay que trazar una gráfica de calibración (log P — datos cromatográficos) con al menos 6 puntos de referencia. La selección de las sustancias de referencia adecuadas depende del criterio del analista. Siempre que sea posible, al menos una sustancia de referencia debe tener un $P_{ow}$ superior al de la sustancia problema, y otra un $P_{ow}$ inferior al de la sustancia problema. En el caso de valores de log P inferiores a 4, la calibración puede basarse en datos obtenidos por el método de frasco de agitación. En el caso de valores de log P superiores a 4, la calibración puede basarse en valores validados aparecidos en la bibliografía, siempre que estos valores estén de acuerdo con los valores calculados. Para mayor precisión, es preferible elegir compuestos de referencia que estén relacionados estructuralmente con la sustancia problema.

Se dispone de amplias listas de valores de log $P_{ow}$ de muchos grupos de productos químicos (2) (3). Si no se tienen datos sobre los coeficientes de reparto de compuestos relacionados estructuralmente, puede utilizarse entonces una calibración más general, establecida con otros compuestos de referencia.

En el apéndice 2 se recoge una relación de sustancias de referencia recomendadas con sus valores de $P_{ow}$.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

1.4.1. **Método de frasco de agitación**

Para determinar un coeficiente de reparto, es necesario conseguir un equilibrio entre los elementos constitutivos del sistema que se influencien mutuamente y determinar las concentraciones de las sustancias disueltas en las dos fases. Examinando la bibliografía existente sobre este tema, se encuentra que pueden utilizarse varias técnicas diferentes para resolver este problema, es decir, la mezcla completa de las dos fases, seguida de su separación, que permita determinar la concentración en equilibrio de la sustancia de ensayo.

1.4.2. **Método de CLAR**

La CLAR se realiza en columnas analíticas rellenas de una fase sólida comercializada con cadenas hidrocarbonadas largas ($C_8$, $C_{18}$, por ejemplo) unidas por enlaces químicos a la sílice. Los productos químicos inyectados en esta columna la recorrerán a diferente velocidad debido a los diferentes grados de reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria hidrocarbonada. Las mezclas de productos químicos se eluyen por orden de hidrofobicidad, saliendo antes los productos hidrosolubles y después los liposolubles, según su coeficiente de reparto hidrocarburo-agua. Esto permite establecer una relación entre el tiempo de retención en una columna de este tipo (de fase inversa) y el coeficiente de reparto n-octanol/agua. El coeficiente de reparto se deduce del factor de capacidad k, dado por la expresión

▼B

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

donde $t_R$ = tiempo de retención de la sustancia problema y $t_o$ = tiempo medio que necesita una molécula de disolvente para recorrer la columna (tiempo muerto).

No es necesario utilizar métodos analíticos cuantitativos, sino solo determinar los tiempos de elución.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

1.5.1. **Repetibilidad**

*Método de frasco de agitación*

Para obtener un coeficiente de reparto preciso, se harán determinaciones por duplicado en tres series de condiciones de ensayo diferentes, pudiendo variar tanto la cantidad de sustancia especificada como la relación de volumen de los disolventes. Los logaritmos de los valores determinados del coeficiente de reparto deberán situarse en un intervalo de ± 0,3 unidades logarítmicas.

*Método de CLAR*

Para aumentar la confianza de la medida, deben hacerse las determinaciones por duplicado. Los valores de log P procedentes de las distintas medidas deben estar dentro de un intervalo de ± 0,1 unidades logarítmicas.

1.5.2. **Sensibilidad**

*Método de frasco de agitación*

El intervalo de medida del método está determinado por el límite de detección del procedimiento analítico. Esto debe ser suficiente para evaluar los valores de log $P_{ow}$ en el intervalo de - 2 a 4 (a veces, bajo ciertas condiciones, este intervalo puede ampliarse hasta un log $P_{ow}$ de 5), cuando la concentración del soluto en cada fase no sobrepase los 0,01 moles por litro.

*Método de CLAR*

El método de CLAR permite la evaluación de coeficientes de reparto en el intervalo de log $P_{ow}$ entre 0 y 6.

En principio, el coeficiente de reparto de un compuesto puede estimarse en el margen de ± 1 unidad logarítmica del valor obtenido con el frasco de agitación. En la bibliografía se encuentran correlaciones típicas (4) (5) (6) (7) (8). Normalmente puede obtenerse mayor precisión cuando los gráficos de correlación se basan en compuestos de referencia relacionados estructuralmente (9).

▼B

1.5.3. **Especificidad**

*Método de frasco de agitación*

La ley de reparto de Nernst solo se aplica a temperatura, presión y pH constantes para las soluciones diluidas. Estrictamente se aplica a una sustancia pura dispersada entre dos disolventes puros. Los resultados pueden ser modificados por la aparición simultánea, en una o ambas fases, de varios solutos diferentes.

La disociación o la asociación de las moléculas disueltas se traduce en desviaciones respecto a la ley de reparto citada. Estas desviaciones se observan porque el coeficiente de reparto pasa a depender entonces de la concentración de la solución.

Debido a los múltiples equilibrios implicados, este método de ensayo no debe aplicarse sin corregir a los compuestos ionizables. Para estos compuestos debe considerarse la utilización de soluciones amortiguadoras en lugar de agua; el pH de la solución amortiguadora debe diferir del pKa de la sustancia al menos en una unidad de pH y hay que tener en cuenta la importancia de este pH para el medio ambiente.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Estimación preliminar del coeficiente de reparto**

El valor del coeficiente de reparto puede estimarse preferentemente mediante un método de cálculo (véase el apéndice 1), o bien, cuando sea adecuado, utilizando la relación de las solubilidades de la sustancia de ensayo en los disolventes puros (10).

1.6.2. **Método de frasco de agitación**

1.6.2.1. *Preparación*

n-Octanol: la determinación del coeficiente de reparto debe hacerse recurriendo a un reactivo de calidad analítica.

Agua: utilizar agua destilada o bidestilada procedente de un aparato de cristal o de cuarzo. En el caso de compuestos ionizables, puede ser necesario utilizar soluciones amortiguadoras en lugar de agua.

*Nota:*

Evitar el agua extraída directamente de un intercambiador de iones.

1.6.2.1.1. Presaturación de los disolventes

Antes de determinar un coeficiente de reparto, se saturan recíprocamente las fases del sistema de disolventes agitándolas a la temperatura de ensayo. Para realizar esto, es preciso agitar durante 24 horas, en un agitador mecánico, dos grandes frascos que contengan n-octanol puro de calidad analítica o agua, con una cantidad suficiente del otro disolvente y dejarlos reposar hasta que se separen las fases y se alcance el estado de saturación.

▼B

1.6.2.1.2. Preparación para el ensayo

El volumen del sistema bifásico debe llenar casi completamente el recipiente de ensayo para evitar cualquier pérdida de materia debida a la volatilización. La relación de volumen y las cantidades de sustancia que deben utilizarse se determinan de la siguiente manera:

— estimación preliminar del coeficiente de reparto (véase más arriba),

— cantidad mínima de sustancia de ensayo requerida para el procedimiento analítico utilizado,

— límite de concentración máxima en cada fase de 0,01 moles por litro.

Se efectúan tres ensayos. En el primero se utiliza la relación calculada de volúmenes de n-octanol y agua, en el segundo se divide por dos esta relación, y en el tercero se multiplica por dos esta relación (por ejemplo, 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Sustancia de ensayo

Se prepara una solución de reserva en n-octanol presaturado con agua. La concentración de esta solución de reserva debe determinarse con precisión antes de utilizarla para determinar el coeficiente de reparto. Esta solución deberá guardarse en condiciones que garanticen su estabilidad.

1.6.2.2. *Condiciones de ensayo*

La temperatura de ensayo debe mantenerse constante (± 1 $^{o}$C) y situarse en el intervalo de 20 $^{o}$C a 25 $^{o}$C.

1.6.2.3. *Procedimiento de medida*

1.6.2.3.1. Establecimiento del equilibrio de reparto

Para cada serie de condiciones de ensayo, preparar recipientes de ensayo por duplicado con las cantidades requeridas, cuidadosamente medidas, de los dos disolventes, así como la cantidad necesaria de solución de reserva.

Medir los volúmenes de las fases de n-octanol. Colocar en un agitador apropiado o agitar a mano los recipientes de ensayo. En caso de usar un tubo para centrifugar, un método que se recomienda consiste en hacer girar rápidamente 180 grados alrededor de su eje transversal el tubo, de forma que el aire que pudiera haber quedado retenido atraviese las dos fases. La experiencia muestra que 50 giros de este tipo suelen ser suficientes para establecer el equilibrio de reparto. Para mayor seguridad, se recomienda hacer 100 giros en 5 minutos.

1.6.2.3.2. Separación de las fases

Cuando sea necesario para separar las fases, centrifugar la mezcla. Efectuar esta operación con una centrífuga de laboratorio mantenida a temperatura ambiente o, si se utiliza una centrífuga sin control de temperatura, equilibrar los tubos de centrífuga a la temperatura de ensayo durante por lo menos una hora antes del análisis.

▼B

1.6.2.4. *Análisis*

Para determinar el coeficiente de reparto, es necesario analizar las concentraciones de la sustancia de ensayo en las dos fases. Para ello, se puede extraer una alícuota de cada una de las dos fases de cada tubo, para cada serie de condiciones de ensayo, y analizarlas según el procedimiento elegido. Debe calcularse la cantidad total de sustancia presente en las dos fases y compararla con la cantidad introducida inicialmente.

La muestra de la fase acuosa debe tomarse por un procedimiento que reduzca al mínimo el riesgo de incorporar trazas de n-octanol: para ello se puede utilizar una jeringuilla de cristal con aguja intercambiable; en primer lugar hay que llenar parcialmente de aire la jeringuilla y a continuación expulsarlo lentamente mientras se va introduciendo al mismo tiempo la aguja a través de la capa de n-octanol. Extraer un volumen adecuado de fase acuosa. Retirar rápidamente la jeringuilla de la solución y quitar la aguja. El contenido de la jeringuilla se podrá utilizar entonces como muestra acuosa. La concentración en las dos fases diferentes deberá determinarse, preferentemente, mediante un procedimiento específico de la sustancia. Algunos ejemplos de métodos analíticos que pueden ser adecuados son:

— métodos fotométricos,

— cromatografía en fase gaseosa,

— cromatografía líquida de alta resolución.

1.6.3. **Método de CLAR**

1.6.3.1. *Preparación*

*Aparatos*

Se necesita un cromatógrafo de líquidos, dotado de una bomba de caudal constante y un instrumento de detección adecuado. Es recomendable el uso de una válvula de inyección con circuito de inyección. La presencia de grupos polares en la fase estacionaria puede afectar gravemente al funcionamiento de la columna de CLAR; por tanto, las fases estacionarias deben presentar la mínima proporción posible de grupos polares (11). Pueden utilizarse rellenos de fase inversa con micropartículas o columnas ya rellenas, disponibles comercialmente. Puede ponerse una columna de seguridad entre el sistema de inyección y la columna de análisis.

*Fase móvil*

Para preparar el disolvente de elución, del que se eliminarán los gases disueltos antes de utilizarlo, se empleará metanol para CLAR y agua para CLAR. Se empleará la elución isocrática. Se utilizarán mezclas de metanol/agua en que el contenido mínimo de agua será del 25 %. La mezcla típica de metanol-agua en la proporción de 3:1 (v/v) es satisfactoria para eluir compuestos de log P 6 en el plazo de una hora con un caudal de 1 ml/min. En el caso de compuestos de mayor log P puede ser necesario abreviar el tiempo de elución (y el de los compuestos de referencia) disminuyendo la polaridad de la fase móvil o la longitud de la columna.

Las sustancias muy poco solubles en n-octanol tienden a dar valores de log $P_{ow}$ anormalmente bajos con el método de CLAR; los picos de estos compuestos acompañan a veces al frente de disolvente. Esto se debe probablemente al hecho de que el proceso de reparto es demasiado lento como para alcanzar el equilibrio en el tiempo necesario normalmente en una separación por CLAR. Si se disminuye el caudal y/o se baja la proporción metanol/agua es posible obtener un valor fiable.

▼B

Las sustancias de ensayo y de referencia deben ser solubles en la fase móvil en concentraciones suficientes para permitir su detección. Solo podrán añadirse aditivos a la mezcla metanol-agua en casos excepcionales, ya que los aditivos cambian las propiedades de la columna. Si se trata de cromatogramas con aditivos, es obligatorio utilizar una columna independiente del mismo tipo. Si la mezcla metanol-agua no es adecuada, pueden utilizarse otras mezclas de disolventes orgánicos con agua, como etanol-agua o acetonitrilo-agua.

El pH del eluyente es fundamental para los compuestos ionizables. Debe situarse en el intervalo de pH de funcionamiento de la columna, que suele estar entre 2 y 8. Se recomienda el uso de soluciones amortiguadoras, Hay que evitar la precipitación de sales y el deterioro de la columna que se producen con algunas mezclas de fase orgánica con soluciones amortiguadoras. Las medidas de CLAR con fases estacionarias a base de sílice con el pH superior a 8 no son recomendables porque el uso de una fase móvil alcalina puede provocar una rápida alteración de las características de la columna.

*Solutos*

Los compuestos de referencia deben tener la mayor pureza posible. Si es posible, los compuestos que se vayan a utilizar en el ensayo o en la calibración se disolverán en la fase móvil.

*Condiciones de ensayo*

La temperatura durante las medidas no debe variar más de ± 2 K.

1.6.3.2. **Medida**

*Cálculo del tiempo muerto $t_0$*

El tiempo muerto $t_0$ puede determinarse utilizando una serie homóloga (por ejemplo, n-alquil-metil-cetonas) o bien compuestos orgánicos no retenidos (por ejemplo, tiourea o formamida). Para calcular el tiempo muerto $t_0$ utilizando una serie homóloga, se inyectarán al menos 7 miembros de una serie homóloga y se determinarán sus respectivos tiempos de retención. Los tiempos de retención, medidos directamente, $t_{r\ (n_c + 1)}$, se representan gráficamente en función de $t_{r(n_c)}$ y se determinan la ordenada en el origen a y la pendiente b de la ecuación de regresión:

$$t_{r(nc + 1)} = a + b\ t_{r(nc)}$$

siendo $n_c$ = número de átomos de carbono. El tiempo muerto $t_0$ viene dado por:

$$t_0 = a/(1 - b)$$

▼B

*Gráfico de calibración*

El paso siguiente es construir una gráfica de correlación de log k frente a log P para los compuestos de referencia adecuados. En la práctica, se inyecta simultáneamente una serie de 5 a 10 compuestos patrón de referencia cuyo log P esté alrededor del intervalo supuesto, y se determinan los tiempos de retención, preferiblemente con un integrador-registrador unido al sistema de detección. Se calculan los respectivos logaritmos de los factores de capacidad, log K, y se representan en función del log P determinado según el método de frasco de agitación. La calibración se realiza a intervalos regulares, al menos una vez al día, de forma que puedan tenerse en cuenta los posibles cambios en las características de la columna.

*Determinación del factor de capacidad de la sustancia de ensayo*

Se inyecta la cantidad más pequeña posible de sustancia de ensayo en fase móvil. Se determina (por duplicado) el tiempo de retención para calcular el factor de capacidad k. A partir de la gráfica de correlación de los compuestos de referencia puede interpolarse el coeficiente de reparto de la sustancia de ensayo. Cuando los coeficientes de reparto son muy altos o muy bajos es necesario hacer una extrapolación y en estos casos hay que tener muy en cuenta los límites de confianza de la línea de regresión.

2. **RESULTADOS**

*Método de frasco de agitación*

La fiabilidad de los valores determinados de P puede verificarse procediendo a una comparación de las medias de las determinaciones efectuadas por duplicado frente a la media general.

3. **INFORME**

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

— especificación precisa de la sustancia (identidad e impurezas),

— cuando no puedan aplicarse los métodos (por ejemplo, con productos tensoactivos), habrá que dar un valor calculado o una estimación a partir de las solubilidades en n-octanol y agua por separado,

— toda la información y las observaciones que sean útiles para la interpretación de los resultados, especialmente en lo relativo a las impurezas y al estado físico de la sustancia.

*Para el método de frasco de agitación:*

— resultado de la estimación previa, en su caso,

— temperatura de la determinación,

— datos sobre los procedimientos analíticos utilizados para determinar las concentraciones,

— tiempo y velocidad de la centrifugación, en su caso,

▼B

— concentraciones medidas en ambas fases en cada determinación (es decir, hay que indicar un total de 12 concentraciones),

— peso de la sustancia de ensayo, volumen de cada fase empleado en cada recipiente de ensayo y cantidad calculada total de sustancia de ensayo presente en cada fase tras el equilibrado,

— valores calculados del coeficiente de reparto (P) y media de cada conjunto de condiciones de ensayo, así como la media de todas las determinaciones. Si hay alguna indicación de que el coeficiente de reparto puede variar con la concentración, habrá que señalarlo en el informe,

— desviación típica de los distintos valores de P respecto a su media,

— media del valor P de todas las determinaciones, expresada también en logaritmo decimal,

— valor teórico calculado de $P_{ow}$ cuando este valor se haya determinado o cuando el valor medido sea superior a $10^4$,

— pH del agua utilizada y fase acuosa durante la prueba,

— si se utilizan soluciones amortiguadoras, hay que justificar su uso en lugar del agua e indicar su composición, concentración y pH, así como el pH de la fase acuosa antes y después del ensayo.

*Para el método de CLAR:*

— resultado de la estimación previa, en su caso,

— sustancias de ensayo y de referencia, con sus purezas,

— intervalo de temperatura de las determinaciones,

— pH al que se hacen las determinaciones,

— características de las columnas de análisis y de seguridad, fase móvil y sistema de detección,

— datos de la retención y valores de log P de la bibliografía correspondiente a las sustancias de referencia utilizadas en la calibración,

— datos de la recta de regresión ajustada (log K frente a log P),

— datos de retención media y valor interpolado de log P del compuesto problema,

— descripción del equipo y condiciones de funcionamiento,

— perfiles de elución,

— cantidades de sustancias problema y de referencia introducidas en la columna,

— tiempo muerto y método para medirlo.

▼B

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París, 1981, Test Guideline 107, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) C. Hansch y A.J. Leo, Substituent Constants for Correlaticn Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Nueva York, 1979.

(3) Log P and Parameter Database, A tool for the quantitative prediction of bioactivity (C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir.) — Available from Pomona College Medical Chemistry Proiect. 1982, Pomona College, Claremont, California 91711.

(4) L. Renberg, G. Sundström y K. Sundh-Nygärd, Chemosphere, 1981, vol. 80, 683.

(5) H. Ellgehausen, C. D'Hondt y R. Fuerer, Pestic. Sci., 1981, vol. 12, 212.

(6) B. McDuffie, Chemosphere, 1981, vol. 10, 73.

(7) W.E. Hammers et al., J. Chromatogr., 1982, vol. 247, 1.

(8) J.E. Haky y A.M. Young, J. Liq. Chromat., 1984, vol. 7, 675.

(9) S. Fujisawa y E. Masuhara, J. Biomed. Mat. Res., 1981, vol. 15, 787.

(10) O. Jubermann, Verteilen und Extrahieren, in Methoden der Organischen Chemie (Houben Weyl), Allgemeine Laboratoriumpraxis (editado por E. Muller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1958, Band I/1, 223-339.

(11) R.F. Rekker y H.M. de Kort, Euro. J Med. Chem., 1979, vol. 14, 479.

(12) A. Leo, C. Hansch y D. Elkins, Partition coefficients and their uses. Chem. Rev., 1971, Vol. 71, 525.

(13) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmenta] Constant, Elsevicr, Amsterdam, 1977.

(14) NF T 20-043 AFNOR (1985). Chemical products for industrial use — Determination of partition coefficient — Flask shaking method.

(15) C.V. Eadsforth y P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1 459.

(16) A. Leo, C. Hansch y D. Elkins, Chem. Rev, 1971, vol. 71, 525.

(17) C. Hansch, A Leo, S.H. Unger, K.H. Kim, D. Nikaitani y E.J. Lien, J. Med. Chem., 1973, vol. 16, 1 207.

(18) W.B. Neely, D.R. Branson y G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1 113.

(19) D.S. Brown y E.W. Flagg,]. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.

(20) J.K. Seydel y K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weínheim, Nueva York, 1979.

▼B

(21) R. Franke, Theoretical Drug Design Methods, Elsevier, Amsterdam, 1984.

(22) Y.C. Martin, Quantitative Drug Design, Marcel Dekker, Nueva York, Basilea, 1978.

(23) N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; J. Med. Chem., 1976, vol. 19, 615.

▼B

*Apéndice 1*

**Métodos de cálculo y estimación**

**INTRODUCCIÓN**

En *Handbook of Chemical Property Estimation Methods* (a) se ofrece una introducción general de los métodos de cálculo, junto con datos y ejemplos.

Los valores calculados de $P_{ow}$ pueden utilizarse:

— para decidir cuál de los métodos experimentales es adecuado (intervalo del método de frasco de agitación: log $P_{ow}$ entre — 2 y 4; intervalo del método de CLAR: log $P_{ow}$ entre 0 y 6),

— para seleccionar las condiciones de ensayo adecuadas (por ejemplo, sustancias de referencia para procedimientos de CLAR, relación de volúmenes n-octanol/agua para el método de frasco de agitación),

— como control interno del laboratorio para detectar posibles errores experimentales,

— para dar una estimación de $P_{ow}$ en casos en que los métodos experimentales no puedan aplicarse por causas técnicas.

**MÉTODO DE ESTIMACIÓN**

*Estimación previa del coeficiente de reparto*

El valor del coeficiente de reparto puede estimarse a partir de las solubilidades de la sustancia problema en los disolventes puros:

$$P_{estimado} = \frac{c_{n-octanol}\text{de saturación}}{c_{agua}\text{de saturación}}$$

**MÉTODOS DE CÁLCULO**

*Principio de los métodos de cálculo*

Todos los métodos de cálculo se basan en la fragmentación formal de la molécula en subestructuras adecuadas de las que se conocen incrementos fiables de log $P_{ow}$. El log $P_{ow}$ de toda la molécula se calcula entonces como la suma de los valores de los fragmentos correspondientes más unos términos de corrección por las interacciones intramoleculares.

Existen listas de constantes de fragmentos y términos de corrección (b) (c) (d) (e). Algunas se actualizan periódicamente (b).

**Criterios cualitativos**

En general, la habilidad del método de cálculo va disminuyendo al aumentar la complejidad del compuesto estudiado. En el caso de moléculas simples de bajo peso molecular y uno o dos grupos funcionales, puede esperarse una desviación de 0,1 a 0,3 unidades logarítmicas de $P_{ow}$ entre los resultados de los diferentes métodos de fragmentación y el valor medido. Si se trata de moléculas más complejas, el margen de error puede ser mayor, dependiendo de la fiabilidad y disponibilidad de constantes de fragmentos, así como de la capacidad de detectar interacciones intramoleculares (por ejemplo, enlaces de hidrógeno) y del uso adecuado de los términos de corrección (problema menos arduo con los programas de ordenador CLOGP-3) (b). En el caso de compuestos ionizados, es importante considerar correctamente la carga o el grado de ionización.

▼B

**Procedimientos de cálculo**

*Método de π de Hansch*

La constante del sustituyente hidrofóbico original, π, introducida por Fujita *et al.* (f) se define como:

$\pi_x = \log P_{ow}$ (PhX) - $\log P_{ow}$ (PhH)

donde $P_{ow}$ (PhX) es el coeficiente de reparto de un derivado aromático y $P_{ow}$ (PhH) el del compuesto original.

(P.y. $\pi_{Cl} = \log P_{ow} (C_6H_5Cl) - \log P_{ow} (C_6H_6) = 2{,}84 - 2{,}13 = 0{,}71$).

Según esta definición, el método de π es aplicable principalmente a la sustitución aromática. Se han tabulado los valores de π de gran número de sustituyentes (b) (c) (d) y se utilizan para calcular el log $P_{ow}$ de moléculas o subestructuras aromáticas.

*Método de Rekker*

Según Rekker (g), el valor de log $P_{ow}$ se calcula de la manera siguiente:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j$$

donde $f_i$ representa las constantes de los diferentes fragmentos moleculares y $a_i$ la frecuencia de su aparición en la molécula estudiada. Los términos de corrección pueden expresarse como integral múltiple de una sola constante $C_m$ (llamada «constante mágica»). Las constantes de fragmentos $f_i$ y $C_m$ se han obtenido a partir de una lista de 1 054 valores experimentales de $P_{ow}$ (825 compuestos) mediante análisis de regresión múltiple (c) (h). La determinación de los términos de interacción se lleva a cabo según normas establecidas recogidas en a bibliografía (e) (h) (i).

*Método de Hansch-Leo*

Según Hansch y Leo (c), el valor de log $P_{ow}$ se calcula de la forma siguiente:

$$\log P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

donde $f_i$ representa las constantes de los diferentes fragmentos moleculares; $F_j$, los términos de corrección, y $a_i$ y $b_j$ las frecuencias correspondientes de presencia. A partir de valores experimentales de $P_{ow}$, se establecieron por el método de tanteo una lista de valores de fragmentos atómicos y de grupos y una lista de términos de corrección $F_j$ (llamados «factores»). Los términos de corrección se han ordenado en varias clases diferentes (a) (c). Es bastante complicado y exige mucho tiempo el tener en cuenta todas las normas y los términos de corrección. Se han ideado programas informáticos (b).

*Método combinado*

El cálculo de log $P_{ow}$ de moléculas complejas puede mejorarse considerablemente si se divide la molécula en grandes subestructuras de las que se conozcan valores fiables de log $P_{ow}$ a partir de listas (b) (c) o por mediciones propias. Estos fragmentos (por ejemplo, heterociclos, antraquinona, azobenceno) pueden combinarse con los valores π de Hansch o con las constantes de fragmentos de Rekker o Leo.

**Observaciones**

i) Los métodos de cálculo solo pueden aplicarse a compuestos parcial o completamente ionizados, si es posible tener en cuenta los necesarios factores de corrección.

▼B

ii) Si puede suponerse la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares, hay que añadir los correspondientes términos de corrección (aproximadamente, de + 0,6 a + 1,0 unidades logarítmicas de $P_{ow}$) (a). La presencia de tales enlaces puede suponerse a partir de modelos estéricos o datos espectroscópicos de la molécula.

iii) Si son posibles varias formas tautoméricas, debe usarse como base para el cálculo la forma más probable.

iv) Hay que seguir cuidadosamente las revisiones de las listas de constantes de fragmentos.

**Informe**

Cuando se utilicen métodos de cálculo/estimación, el informe del ensayo incluirá, a ser posible, la siguiente información:

— descripción de la sustancia (mezcla, impurezas, etc.),

— indicación de cualquier posible enlace de hidrógeno intramolecular, disociación, carga o cualquier otro efecto poco común (por ejemplo, tautomería),

— descripción del método de cálculo,

— indicación o suministro de la base de datos,

— peculiaridades de la selección de los fragmentos,

— documentación exhaustiva de los cálculos.

**BIBLIOGRAFÍA**

(a) W.J. Lyman, W.F. Reehl y D.H. Rosenblatt (ed.), Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, Nueva York, 1983.

(b) Pomona College, Medical Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(c) C. Hansch, A.J. Leo, Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Nueva York, 1979.

(d) A. Leo, C. Hansch, D. Elkins, Chem. Rev., 1971, vol. 71, 525.

(e) R.F. Rekker, H.M. de Kort, Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther., 1979, vol. 14, 479.

(f) T. Fujita, J. Iwasa y C. Hansch, J. Amer. Chem. Soc, 1964, vol. 86, 5175.

(g) R.F. Rekker, The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, vol. 1 Elsevier, Nueva York, 1977.

(h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12, 1459.

(i) R.A. Scherrer, ACS — American Chemical Society, Washington D. C, 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

*Apéndice 2*

**Sustancias de referencia recomendadas para el método de CLAR**

| № | Sustancia de referencia | log $P_{ow}$ | pKa |
|---|---|---|---|
| 1 | 2-Butanona | 0,3 | |
| 7 | 4-Acetilpiridina | 0,5 | |
| 3 | Anilina | 0,9 | |
| 4 | Acetanilida | 1,0 | |
| 5 | Alcohol bencílico | 1,1 | |
| 6 | p-Metoxifenol | 1,3 | pKa = 10,26 |
| 7 | Ácido fenoxiacético | 1,4 | pKa = 3,12 |
| 8 | Fenol | 1,5 | pKa = 9,92 |
| 9 | 2,4-Dinitrofenol | 1,5 | pKa = 3,96 |
| 10 | Benzonitrilo | 1,6 | |
| 11 | Fenilacetonitrilo | 1,6 | |
| 12 | Alcohol 4-metilbencílico | 1,6 | |
| 13 | Acetofenona | 1,7 | |
| 14 | 2-Nitrofenol | 1,8 | pKa = 7,17 |
| 15 | Ácido 3-nitrobenzoico | 1,8 | pKa = 3,47 |
| 16 | 4-Cloranilina | 1,8 | pKa = 4,15 |
| 17 | Nitrobenceno | 1,9 | |
| 18 | Alcohol cinámico | 1,9 | |
| 19 | Ácido benzoico | 1,9 | pKa = 4,19 |
| 20 | p-Cresol | 1,9 | pKa = 10,17 |
| 21 | Ácido cinámico | 2,1 | pKa = 3,89 cis 4,44 trans |
| 22 | Anisol | 2,1 | |
| 23 | Metilbenzoato | 2,1 | |
| 24 | Benceno | 2,1 | |
| 25 | Ácido 3-metilbenzoico | 2,4 | pKa = 4,27 |
| 26 | 4-Clorofenol | 2,4 | pKa = 9,1 |
| 27 | Tricloroetileno | 2,4 | |
| 28 | Atrazina | 2,6 | |
| 29 | Etilbenzoato | 2,6 | |
| 30 | 2,6-Diclorobenzonitrilo | 2,6 | |
| 31 | Ácido 3-clorobenzoico | 2,7 | pKa = 3,82 |
| 32 | Tolueno | 2,7 | |
| 33 | 1-Naftol | 2,7 | pKa = 9,34 |
| 34 | 2,3-Dicloroanilina | 2,8 | |
| 35 | Clorobenceno | 2,8 | |
| 36 | Alil-feniléter | 2,9 | |
| 37 | Bromobenceno | 3,0 | |

▼B

| № | Sustancia de referencia | log $P_{ow}$ | pKa |
|---|---|---|---|
| 38 | Etilbenceno | 3,2 | |
| 39 | Benzofenona | 3,2 | |
| 40 | 4-Fenilfenol | 3,2 | pKa = 9,54 |
| 41 | Timol | 3,3 | |
| 42 | 1,4-Diclorobenceno | 3,4 | |
| 43 | Difenilamina | 3,4 | pKa = 0,79 |
| 44 | Nafraleno | 3,6 | |
| 45 | Fenilbenzoato | 3,6 | |
| 46 | Isopropilbenceno | 3,7 | |
| 47 | 2,4,6-Triclorofenol | 3,7 | pKa = 6 |
| 48 | Bifenilo | 4,0 | |
| 49 | Bencilbenzoato | 4,0 | |
| 50 | 2,4-Dinitro-6 sec. butilfenol | 4,1 | |
| 51 | 1,2,4-Triclorobenceno | 4,2 | |
| 52 | Ácido dodecanoico | 4,2 | |
| 53 | Difeniléter | 4,2 | |
| 54 | n-Butilbenceno | 4,5 | |
| 55 | Fenantreno | 4,5 | |
| 56 | Fluoranteno | 4,7 | |
| 57 | Dibencilo | 4,8 | |
| 58 | 2,6-Difenilpiridina | 4,9 | |
| 59 | Trifenilamina | 5,7 | |
| 60 | DDT | 6,2 | |
| | Otras sustancias de referencia de bajo log $P_{ow}$ | | |
| 1 | Ácido nicotínico | -0,07 | |

▼B

## A.9. PUNTO DE INFLAMACIÓN

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de datos preliminares sobre la inflamabilidad de la sustancia antes de proceder al ensayo. Este procedimiento es aplicable a las sustancias líquidas cuyos vapores pueden ser inflamados por fuentes de ignición. Los métodos de ensayo descritos en el presente documento solo son válidos para los intervalos de punto de inflamación especificados en cada uno de los distintos métodos.

A la hora de seleccionar el método hay que tener en cuenta las posibles reacciones químicas entre la sustancia y el soporte de la muestra.

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El punto de inflamación es la temperatura mínima, corregida a una presión de 101,325 kPa, a la cual un líquido desprende vapores, en las condiciones definidas en el método de ensayo, en una cantidad tal que se produzca una mezcla vapor/aire inflamable en el recipiente del ensayo.

Unidad: $^{o}C$

$t = T - 273,15$

(t en $^{o}C$ y T en K)

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es necesario utilizar sustancias de referencia cada vez que se examina una nueva sustancia. Su principal función es la de servir para comprobar las características del método de vez en cuando y comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se coloca la sustancia en un recipiente de ensayo y se calienta o se enfría hasta la temperatura de ensayo según el procedimiento descrito en cada método concreto. Se hacen pruebas de ignición para observar si la muestra se inflama o no a la temperatura de ensayo.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

##### 1.5.1. **Repetibilidad**

La repetibilidad depende del intervalo del punto de inflamación y del método de ensayo utilizado; máximo 2 $^{o}C$.

##### 1.5.2. **Sensibilidad**

La sensibilidad depende del método de ensayo utilizado.

##### 1.5.3. **Especificidad**

La especificidad de ciertos métodos de ensayo se limita a algunos intervalos de punto de inflamación y depende de las características de la sustancia (por ejemplo, alta viscosidad).

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

Se coloca una muestra de la sustancia problema en un aparato de ensayo, de conformidad con los puntos 1.6.3.1 y/o 1.6.3.2.

Por seguridad, se recomienda para sustancias energéticas o tóxicas seguir un método que exija una muestra pequeña, alrededor de 2 $cm^3$.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

Se debe instalar el aparato lejos de corrientes de aire, siempre que esto no suponga ningún problema de seguridad.

1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

1.6.3.1. *Método de equilibrio*

Véanse las normas ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523 e ISO 3679.

1.6.3.2. *Métodos de no equilibrio*

*Aparato Abel:*

Véanse las normas BS 2000, parte 170, NF M07-011 y NF T66-009.

*Aparato Abel-Pensky:*

Véanse las normas EN 57, DIN 51755 primera parte (para temperaturas de 5 a 65 °C), DIN 51755 segunda parte (para temperaturas inferiores a 5 °C) y NF M07-036.

*Aparato Tag:*

Véase la norma ASTM D-56.

*Aparato Pensky-Martens:*

Véanse las normas ISO 2719, EN 11, DIN 51758, ASTM D 93, BS 2000-34 y NF M07-019.

*Observaciones:*

Cuando el punto de inflamación determinado por un método de no equilibrio del punto 1.6.3.2 tiene los siguientes valores: 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C o 55 ± 2 °C, es conveniente confirmarlo mediante un método de equilibrio utilizando el mismo aparato.

Únicamente se pueden utilizar para la notificación los métodos que puedan dar la temperatura del punto de inflamación.

Para determinar el punto de inflamación de líquidos viscosos (pinturas, gomas, etc.) que contengan disolventes, solo se pueden utilizar los aparatos y métodos de ensayo que permitan determinar el punto de inflamación de los líquidos viscosos.

Véanse las normas ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523 y DIN 53213 primera parte.

▼B

2. **RESULTADOS**

3. **INFORME**

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

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— descripción del método utilizado, así como cualquier desviación,

— los resultados y cualquier otra información u observación que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ninguna.

▼B

## A.10. INFLAMABILIDAD (SÓLIDOS)

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de datos preliminares sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia antes de proceder al ensayo.

El presente método solo es aplicable a las sustancias en polvo, granulosas o pastosas.

Para no englobar todas las sustancias que pueden inflamarse, sino únicamente aquellas que se queman muy rápidamente o cuya forma de combustión es, de una forma u otra, particularmente peligrosa, solo se considerarán como fácilmente inflamables las sustancias cuya velocidad de combustión sobrepase un cierto límite.

Puede ser especialmente peligroso que la incandescencia se propague a través de un polvo metálico debido a las dificultades para apagar un fuego. Los polvos metálicos se considerarán fácilmente inflamables si permiten la difusión de la incandescencia en toda su masa en un tiempo especificado.

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo de combustión expresado en segundos.

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No se especifican.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La sustancia se dispone formando una mecha o cinta continua de unos 250 mm de longitud y se hace un ensayo exploratorio previo para determinar si, al aplicar una llama de gas, se produce la propagación de la combustión con llama o sin ella. Si se produce la propagación a lo largo de 200 mm de la mecha dentro de un tiempo dado, hay que realizar un ensayo completo para determinar la velocidad de combustión.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Ensayo exploratorio previo**

Se pone la sustancia formando una mezcla o cinta continua de unos 250 mm de longitud, 20 mm de anchura y 10 mm de altura, sobre una placa incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica. Una llama fuerte procedente de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm) se aplica a un extremo de la mecha hasta que el polvo empieza a arder o durante un máximo de 2 minutos (5 minutos si se trata de polvos de metales o de aleaciones metálicas). Hay que observar si la combustión se propaga a lo largo de 200 mm de la mecha durante un período de prueba de 4 minutos (o 40 minutos si se trata de polvos metálicos). Si la sustancia no se enciende ni propaga la combustión ardiendo con llama o sin ella a lo largo de 200 mm de la mecha en el plazo de 4 minutos (o 40 minutos), entonces la sustancia no debe considerarse fácilmente inflamable y no es necesario seguir con las pruebas. Si la sustancia propaga la combustión a lo largo de 200 mm de longitud de la mecha en menos de 4 minutos (o menos de 40 minutos si se trata de polvos metálicos), hay que aplicar el procedimiento descrito a continuación (puntos 1.6.2 y siguientes).

1.6.2. **Ensayo de la velocidad de combustión**

1.6.2.1. *Preparación*

En el caso de sustancias en polvo o granulosas se vierte la sustancia sin comprimir dentro de un molde de 250 mm de longitud con una sección transversal triangular de 10 mm de altura interior y 20 mm de anchura. A ambos lados del molde, en sentido longitudinal, se colocan dos placas metálicas a modo de soportes laterales, que deben sobrepasar en 2 mm el borde superior de la sección triangular transversal del molde (véase la figura). A continuación se deja caer tres veces el molde desde una altura de 2 cm, sobre una superficie dura. Si es necesario, se completa el molde de nuevo. A continuación, se retiran las placas laterales y se enrasa. Se coloca sobre el molde una placa no combustible, no porosa y de baja conductividad térmica, se le da la vuelta y se desmolda.

Las sustancias pastosas se extienden sobre una superficie no combustible, no porosa y de baja conductividad térmica, formando un cordón de 250 mm de longitud y alrededor de 1 $cm^2$ de sección.

1.6.2.2. *Condiciones del ensayo*

En el caso de sustancias sensibles a la humedad, hay que efectuar el ensayo lo más rápidamente posible después de retirar la sustancia del recipiente.

1.6.2.3. *Desarrollo del ensayo*

Colocar el dispositivo en el tiro de una campana de gases.

La velocidad del aire debe ser suficiente para evitar que los humos pasen al laboratorio y no debe variar mientras dure el ensayo. Alrededor del dispositivo se pondrá una pantalla.

Se utiliza una llama fuerte procedente de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm) para encender un extremo de la sustancia. Cuando la mecha ha ardido a lo largo de 80 mm, se procede a medir la velocidad de combustión a lo largo de los siguientes 100 mm.

▼B

El ensayo se repite seis veces, usando cada vez una placa fría y limpia, salvo que se obtenga antes un resultado positivo.

2. **RESULTADOS**

Para proceder a la evaluación es preciso conocer el tiempo de combustión del ensayo exploratorio previo (1.6.1) y el menor tiempo de combustión de un máximo de seis ensayos (1.6.2.3).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

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

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— descripción de la sustancia de ensayo y su estado físico, incluida la tasa de humedad,

— resultados del ensayo exploratorio previo y del ensayo de velocidad de combustión, en su caso,

— cualquier observación complementaria que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las sustancias pulverulentas, granulosas o pastosas se deberán considerar fácilmente inflamables cuando el tiempo de combustión de cualquier ensayo efectuado según el procedimiento descrito en el punto 1.6.2 sea inferior a 45 segundos. Deberá considerarse que los polvos metálicos o de aleaciones metálicas son fácilmente inflamables cuando puedan encenderse y la llama o la zona de reacción se extienda a toda la muestra en 10 minutos o menos.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

NF T 20-042 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of solids.

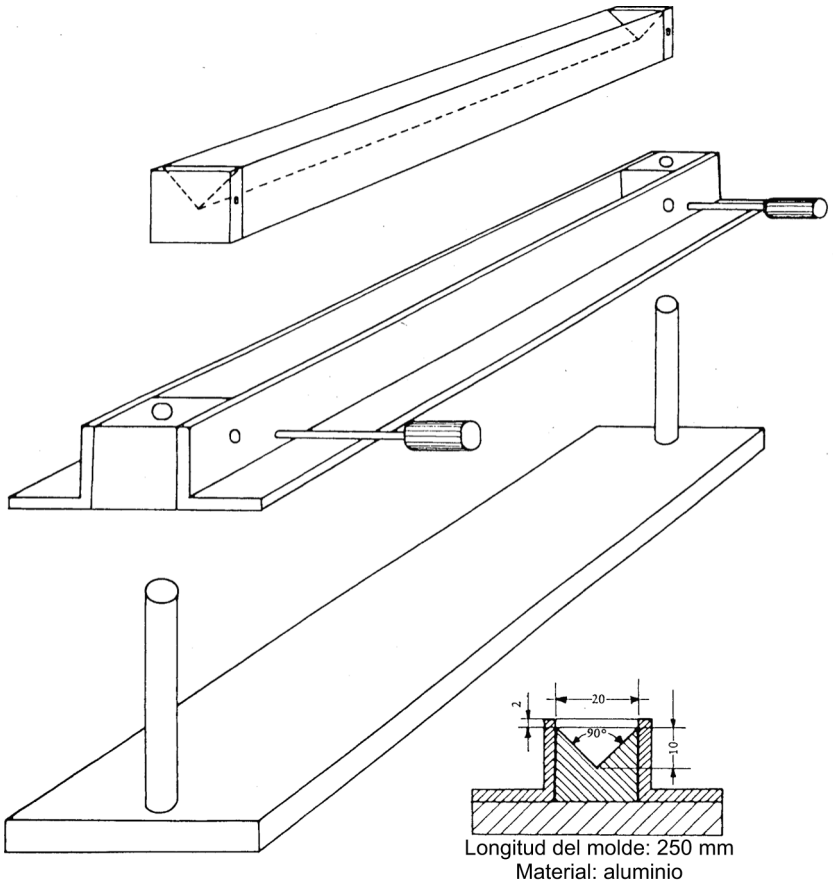
▼B

*Apéndice*

*Figura*

**Molde y accesorios necesarios para la formación de las mechas**

(todas las dimensiones expresadas en milímetros)



▼B

## A.11. **INFLAMABILIDAD (GASES)**

### 1. **MÉTODO**

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método permite determinar si los gases mezclados con el aire a temperatura (alrededor de 20 °C) y presión ambiente son inflamables y, en caso positivo, en qué intervalo de concentraciones. Se exponen a una chispa eléctrica mezclas que contengan concentraciones crecientes de gas problema y se observa si se produce la inflamación.

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El intervalo de inflamabilidad es el intervalo de concentración entre los límites de explosión superior e inferior. Los límites de explosión superior e inferior son los límites de concentración del gas inflamable en mezcla con el aire a los que el fuego no se propaga.

#### 1.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA

No se especifica.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se aumenta gradualmente la concentración del gas en el aire y, en cada etapa, se expone la mezcla a una chispa eléctrica.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

#### 1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

##### 1.6.1. **Equipo**

El recipiente de ensayo es un cilindro de cristal de un diámetro interior de al menos 50 mm y una altura mínima de 300 mm, que se pone verticalmente. Los electrodos de ignición distan de 3 a 5 mm uno del otro y están situados a 60 mm del fondo del cilindro. El cilindro está equipado con una válvula para reducir la presión. El aparato debe estar protegido por un blindaje para limitar los daños de una posible explosión.

La fuente de ignición es una chispa inductiva constante de 0,5 segundos de duración, producida por un transformador de alta tensión con una tensión de salida de 10 a 15 kV (la potencia máxima es de 300 W). En la referencia (2) se describe un ejemplo de equipo adecuado.

##### 1.6.2. **Condiciones del ensayo**

El ensayo debe efectuarse a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

▼B

1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

Mediante bombas dosificadoras se llena el cilindro de cristal con una mezcla de aire y gas de concentración conocida. Se hace saltar una chispa en esta mezcla y se observa si se desprende una llama de la fuente de ignición y se propaga independientemente. Se irá aumentando la concentración de gas en un 1 % de volumen cada vez, hasta que se produzca la inflamación descrita anteriormente.

Si la estructura química del gas indica que debe ser ininflamable y puede calcularse la composición de la mezcla estequiométrica con el aire, solo será necesario someter a ensayo, en etapas del 1 %, mezclas que estén en el intervalo entre el 10 % por debajo y el 10 % por arriba de la composición estequiométrica.

2. **RESULTADOS**

La propagación de la llama constituye el único dato válido para la determinación de esta propiedad.

3. **INFORME**

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

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— descripción del aparato utilizado, mencionando las dimensiones,

— temperatura en el momento del ensayo,

— concentraciones de ensayo, así como los resultados obtenidos,

— resultado del ensayo: gas no inflamable o fácilmente inflamable,

— si se ha llegado a la conclusión de que el gas no es inflamable, se debe indicar el intervalo de concentraciones que se ha sometido a ensayo en etapas del 1 %,

— cualquier información u observación que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

(2) W. Berthold, D. Conrad, T. Grewer, H. Grosse-Wortmann, T. Redeker y H. Schacke. «Entwicklung einer Standard-Apparatur zur Messung von Explosionsgrenzen». Chem.-Ing.-Tech., 1984, vol. 56, 126-127.

▼B

A.12. **INFLAMABILIDAD (EN CONTACTO CON EL AGUA)**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Este método de ensayo puede utilizarse para determinar si la reacción de una sustancia con el agua o el aire húmedo ocasiona el desprendimiento de una cantidad peligrosa de un gas o de varios gases, que puedan ser fácilmente inflamables.

Puede aplicarse tanto a sustancias sólidas como líquidas, pero no a las sustancias que se inflaman espontáneamente en contacto con el aire.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Sustancias fácilmente inflamables: preparados que, en contacto con el agua o el aire húmedo, desprenden una cantidad peligrosa de gases fácilmente inflamables, a una velocidad mínima de 1 l/kg por hora.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo incluye varias fases sucesivas que se describen a continuación; si la inflamación se produce en cualquiera de estas fases no es necesario proseguir el ensayo. Si se sabe que la sustancia no reacciona violentamente con el agua, se pasa directamente a la fase 4 (1.3.4).

1.3.1. **Fase 1**

Se coloca la sustancia problema en una cubeta que contenga agua destilada a 20 °C y se observa si el gas desprendido se inflama o no.

1.3.2. **Fase 2**

Se coloca la sustancia de ensayo en un papel de filtro que flote sobre un recipiente lleno de agua destilada a 20 °C y se observa si el gas que se desprende se inflama o no. El papel de filtro solo sirve para mantener la sustancia en un lugar, lo cual aumenta las probabilidades de inflamación.

1.3.3. **Fase 3**

Se forma con la sustancia de ensayo una pila de 2 cm de altura y 3 cm de diámetro, aproximadamente. Se añaden algunas gotas de agua a la pila y se observa si el gas que se desprende se inflama o no.

1.3.4. **Fase 4**

Se mezcla la sustancia de ensayo con agua destilada a 20 °C y se mide la velocidad de producción de gas durante 7 horas, a intervalos de una hora. Si al cabo de 7 horas la velocidad de producción es variable o va aumentando, debe prolongarse el tiempo de medida hasta un máximo de 5 días. Si, en un momento dado, la velocidad de producción supera 1 l/kg por hora, el ensayo puede darse por acabado.

▼B

1.4. SUSTANCIA DE REFERENCIA

No se especifica.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

1.6.1. **Fase 1**

1.6.1.1. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

1.6.1.2. *Desarrollo del ensayo*

Se coloca una pequeña cantidad (aproximadamente unos 2 mm de diámetro) de la sustancia problema en una cubeta con agua destilada. Observar: i) si hay desprendimiento de gas, y ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

1.6.2. **Fase 2**

1.6.2.1. *Equipo*

Papel de filtro flotando sobre una superficie de agua destilada en un recipiente adecuado, como, por ejemplo, una cubeta de evaporación de 100 mm de diámetro.

1.6.2.2. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

1.6.2.3. *Desarrollo del ensayo*

Se coloca una pequeña cantidad de la sustancia problema (aproximadamente 2 mm de diámetro) sobre el centro del papel de filtro. Observar: i) si hay desprendimiento de gas, y ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

1.6.3. **Fase 3**

1.6.3.1. *Condiciones del ensayo*

El ensayo se realiza a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

1.6.3.2. *Desarrollo del ensayo*

Se forma con la sustancia de ensayo una pila de 2 cm de altura y 3 cm de diámetro, aproximadamente, con un pequeño cráter en la cumbre. Se añaden algunas gotas de agua en el hueco y se observa: i) si hay desprendimiento de gas, y ii) si el gas se inflama. Si se inflama, se considerará que la sustancia es peligrosa y se dará por finalizado el ensayo.

▼B

1.6.4. **Fase 4**

1.6.4.1. *Equipo*

El equipo se monta según se muestra en la figura.

1.6.4.2. *Condiciones del ensayo*

Hay que asegurarse de que el recipiente que contiene la sustancia problema está libre de partículas pulverulentas (tamaño de partícula < 500 μm). Si estas representan más del 1 % en peso del total, o si la muestra es quebradiza, hay que reducir a polvo la sustancia antes de proceder al ensayo, para tener en cuenta la reducción del tamaño de las partículas durante su almacenamiento y manipulación; en caso contrario, la sustancia se utiliza en su forma original. Debe realizarse el ensayo a temperatura ambiente (alrededor de 20 $^{o}$C) y a presión atmosférica.

1.6.4.3. *Desarrollo del ensayo*

Se ponen entre 10 y 20 ml de agua en el embudo cuentagotas del equipo y 10 g de sustancia en el matraz cónico. El volumen de gas producido puede medirse con cualquier método adecuado. Se abre la tapa del embudo cuentagotas para que penetre el agua en el matraz cónico y se pone en marcha un cronómetro. Se mide la producción de gas cada hora a lo largo de un período de 7 horas. Si durante este período la producción de gas es irregular o si al final del período la velocidad de producción de gas está en aumento, hay que continuar con las medidas hasta un máximo de 5 días. Si en cualquier momento de la medida la velocidad de producción de gas pasa de 1 l/kg por hora, puede interrumpirse el ensayo. Este ensayo debe realizarse por triplicado.

Si no se conoce la identidad química del gas, debe analizarse este. Si el gas contiene componentes fácilmente inflamables y si, además, se ignora si el conjunto de la mezcla es fácilmente inflamable, hay que preparar y someter a ensayo una mezcla de la misma composición, de conformidad con el método A.11.

2. **RESULTADOS**

La sustancia se considera peligrosa si:

— se produce ignición espontánea en cualquier fase del desarrollo del ensayo,

o

— se produce gas inflamable a una velocidad superior a 1 l/kg de sustancia por hora.

3. **INFORME**

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

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— datos sobre cualquier preparación inicial de la sustancia problema,

▼B

— resultados de los ensayos (fases 1, 2, 3 y 4),

— identidad química del gas desprendido,

— la velocidad de formación del gas si se realiza la fase 4 (1.6.4),

— cualquier observación complementaria que sea útil para la interpretación de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, test and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

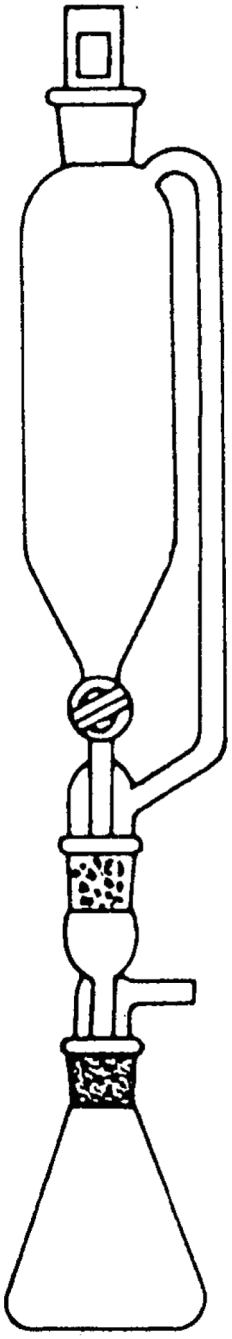
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

*Apéndice*

*Figura*

**Equipo**



▼B

A.13. **PROPIEDADES PIROFÓRICAS DE SÓLIDOS Y LÍQUIDOS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

El procedimiento del ensayo es aplicable a las sustancias sólidas y liquidas que pueden inflamarse espontáneamente poco tiempo después de haber entrado en contacto con el aire a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

Este método de ensayo no puede aplicarse a las sustancias que tienen que exponerse al aire durante varias horas o días a temperatura ambiente o a temperaturas elevadas antes de inflamarse.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Se considera que una sustancia tiene propiedades pirofóricas si, en las condiciones descritas en el punto 1.6, se inflama o se carboniza.

También puede ser necesario estudiar la autoinflamabilidad de líquidos según el método A.15. Temperatura de autoinflamación (líquidos y gases).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No se especifican.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se añade la sustancia, sea sólida o líquida, a un soporte inerte y se pone en contacto con el aire a temperatura ambiente durante un período de 5 minutos. Si las sustancias líquidas no se inflaman, entonces se absorben en papel de filtro y se exponen al aire a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C) durante 5 minutos. Si un sólido o líquido se inflama, o un líquido inflama o carboniza a un papel de filtro, entonces se considera que la sustancia es pirofórica.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Repetibilidad: debido a la importancia en relación con la seguridad, un solo resultado positivo será suficiente para considerar que la sustancia es pirofórica.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. **Equipo**

Llenar una cubeta de porcelana de unos 10 cm de diámetro con una capa de tierra de infusorios, de unos 5 mm de espesor, a temperatura ambiente (alrededor de 20 °C).

Observaciones:

La tierra de infusorios, o cualquier otra sustancia inerte equivalente que se obtenga fácilmente, se tomará como representativa de suelo sobre el que pudiera esparcirse la sustancia en caso de accidente.

El papel de filtro seco es necesario para el ensayo de los líquidos que no se inflaman en contacto con el aire cuando están unidos a un soporte inerte.

▼B

1.6.2. **Realización del ensayo**

a) *Sólidos pulverulentos*

Se vierten 1 o 2 $cm^3$ de la sustancia problema, desde una altura de alrededor de 1 m, sobre una superficie no combustible y se observa si la sustancia se inflama durante la caída o durante los primeros 5 minutos después de depositarse.

El ensayo se realiza seis veces, salvo que se produzca ignición.

b) *Líquidos*

Se vierten 5 $cm^3$ del líquido problema en la cubeta de porcelana preparada y se observa si la sustancia se inflama en un tiempo de 5 minutos.

Si no se observa inflamación durante estos seis ensayos, hay que realizar los siguientes ensayos:

Con una jeringuilla se ponen 0,5 ml de la sustancia en un papel de filtro dentado y se observa si se produce inflamación o carbonización del papel de filtro en el plazo de 5 minutos desde la adición del líquido. El ensayo se realiza tres veces, salvo que se produzca inflamación o carbonización.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

El ensayo puede interrumpirse tan pronto como se obtenga un resultado positivo en cualquiera de las pruebas.

2.2. EVALUACIÓN

Una sustancia se considera pirofórica si se inflama en el plazo de 5 minutos cuando se añade a un soporte inerte y se expone al aire, o bien cuando la sustancia líquida carboniza o inflama un papel de filtro en el plazo de 5 minutos desde que se pone en contacto con este y se expone al aire.

3. **INFORME**

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

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— resultado del ensayo,

— cualquier observación complementaria que sea útil para la interpretación de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

▼B

## A.14. PROPIEDADES EXPLOSIVAS

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

Se trata de un método de ensayo que permite determinar si una sustancia sólida o pastosa presenta o no peligro de explosión cuando se expone al efecto de una llama (sensibilidad térmica) o a un choque o fricción (sensibilidad a estímulos mecánicos), y si una sustancia líquida presenta peligro de explosión cuando se expone al efecto de una llama o un choque.

El método comprende tres partes:

a) un ensayo de sensibilidad térmica (1);

b) un ensayo de sensibilidad mecánica respecto al choque (1);

c) un ensayo de sensibilidad mecánica respecto a la fricción (1).

El método proporciona datos que permiten evaluar la probabilidad de inicio de una explosión por medio de algunos estímulos corrientes. No tiene por objeto determinar si una sustancia puede o no hacer explosión en cualesquiera condiciones.

El método sirve para, determinar si una sustancia presenta peligro de explosión (sensibilidad térmica y mecánica) en las condiciones específicas definidas por la Directiva. En el ensayo se utiliza un cierto número de equipos ampliamente utilizados internacionalmente (1) y que, por regla general, dan resultados convincentes. Hay que reconocer que el método no es definitivo. Pueden utilizarse equipos distintos a los especificados siempre que estén reconocidos internacionalmente y se pueda establecer una buena correlación entre los resultados obtenidos con el equipo alternativo y los del equipo especificado.

No es necesario realizar los ensayos si los datos termodinámicos disponibles (calor de formación, calor de descomposición, etc.) o la ausencia de ciertos grupos reactivos (2) en la fórmula desarrollada permiten establecer de forma razonablemente inequívoca que la sustancia no puede descomponerse rápidamente con formación de gases o liberación de calor (dicho de otro modo, si la materia no presenta ningún riesgo de explosión). No es necesario realizar un ensayo de sensibilidad a la fricción con las sustancias líquidas.

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Explosivos:

Sustancias que puedan hacer explosión bajo el efecto de una llama, o que sean sensibles al choque o a la fricción en el equipo especificado (o que sean más sensibles mecánicamente que el 1,3-dinitrobenceno en un equipo alternativo).

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

1,3-dinitrobenceno, producto cristalino técnico pasado por tamiz de 0,5 mm, para los métodos de fricción y choque.

Perhidro-l,3,5-trinitro-l,3,5-triazina (RDX, hexogen, ciclonita — CAS 121-82-4), recristalizado a partir de ciclohexanona acuosa, tamizado por vía húmeda a través de un tamiz de 250 μm y retenido en un tamiz de 150 μm y secado a 103 ± 2 °C durante 4 horas para la segunda serie de ensayos de fricción y choque.

▼B

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se debe realizar un ensayo preliminar para determinar las condiciones de seguridad que deben presidir la ejecución de los tres ensayos de sensibilidad.

1.4.1. **Pruebas de seguridad en la manipulación (3)**

Por razones de seguridad, antes de pasar a los ensayos principales, se someten muestras muy reducidas (unos 10 mg) de sustancia a un calentamiento sin confinamiento con llama de gas, a choque con cualquier tipo de instrumento adecuado y a fricción utilizando un mazo y un yunque, o cualquier otro tipo de instrumento que sirva para producir fricción. El objetivo es determinar si la sustancia es tan sensible y explosiva que los ensayos de sensibilidad prescritos, especialmente el de sensibilidad térmica, deban realizarse con precauciones especiales a fin de evitar cualquier daño corporal al operario.

1.4.2. **Sensibilidad térmica**

Este método consiste en calentar la sustancia en un tubo de acero cerrado por placas horadadas con agujeros de diferentes diámetros, para determinar si la sustancia puede hacer explosión en condiciones de calor intenso y un confinamiento determinado.

1.4.3. **Sensibilidad mecánica (choque)**

El método consiste en someter la sustancia al choque producido por una masa especificada que se deja caer desde una altura también especificada.

1.4.4. **Sensibilidad mecánica (fricción)**

Este método consiste en someter la sustancia sólida o pastosa a una fricción entre superficies tipo, en condiciones específicas de carga y de movimiento relativo.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No se indican.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Sensibilidad térmica (efecto de la llama)**

1.6.1.1. *Equipo*

El equipo consiste en un tubo de acero no reutilizable con un sistema de cierre reutilizable (figura 1), instalado en un instrumento de calefacción y protección. Cada tubo se obtiene por embutido de una lámina de acero (véase el apéndice) y tiene 24 mm de diámetro interior, 75 mm de longitud y 0,5 mm de espesor de pared. Los tubos tienen un reborde en el extremo abierto para que se puedan cerrar con el dispositivo de la placa horadada. Este dispositivo consiste en una placa horadada resistente a la presión, con un orificio central, unido firmemente al tubo mediante una junta aterrajada en dos partes (tuerca y abrazadera de rosca); esta junta está hecha de acero al cromo-manganeso (véase el apéndice) exento de chispas hasta 800 $^{o}$C. Las placas horadadas tienen 6 mm de espesor, están hechas de acero resistente al calor (véase el apéndice) y pueden escogerse con varios diámetros de abertura.

▼B

1.6.1.2. *Condiciones del ensayo*

Normalmente se somete a ensayo la sustancia tal como llega al laboratorio, aunque en algunos casos (por ejemplo, si está prensada, fundida o condensada de alguna otra forma) puede ser necesario estudiar la sustancia después de triturarla.

Si se trata de un sólido, la masa de material que debe utilizarse en cada ensayo se determina mediante un proceso seco de dos fases. Se llena un tubo tarado con 9 $cm^3$ de sustancia y esta se apisona aplicando una fuerza de 80 N a toda la sección transversal del tubo. La forma de llenar el tubo puede ser distinta por razones de seguridad o en caso de que la forma física de la muestra pueda cambiar por la compresión; por ejemplo, si la sustancia es muy sensible a la fricción, no puede apisonarse. Si el material es compresible, se añade más cantidad y se vuelve a apisonar hasta que la altura del relleno queda a 55 mm de la boca. Se determina la masa total utilizada para llenar el tubo hasta el nivel de 55 mm y se hacen dos adiciones más, cada una apisonada con una fuerza de 80 N. Entonces, según sea necesario, se añade más material y se apisona o bien se extrae para dejar la altura del relleno a 15 mm de la boca. Se lleva a cabo un segundo proceso seco, empezando con una cantidad igual a un tercio de la masa total utilizada en el primer proceso seco, y se apisona esta cantidad. Se añaden otros dos incrementos de esta cantidad con apisonamiento de 80 N y se ajusta el nivel de la sustancia en el tubo a 15 mm de la boca por adición o extracción de material, según sea necesario. La cantidad de sólido determinada en el segundo proceso seco es la que se utilizará en cada ensayo; el llenado se hace en tres cantidades iguales, comprimida cada una a 9 $cm^3$ mediante la fuerza que sea necesaria. (Puede ser más fácil utilizar anillos separadores.)

Los líquidos y geles se cargan en el tubo hasta una altura de 60 mm teniendo especial cuidado con los geles para evitar la formación de vacíos. La abrazadera de rosca se desliza sobre el tubo desde el fondo, se inserta la placa horadada correspondiente y se aprieta la tuerca después de poner un lubricante a base de disulfuro de molibdeno. Es muy importante comprobar que no queda nada de sustancia aprisionada entre el reborde y la placa o en las roscas.

La fuente de calor es propano procedente de una botella industrial, provisto de un regulador de presión (60 a 70 mbar), que pasa a través de un contador y mediante un distribuidor se reparte en cuatro mecheros de forma equilibrada (lo que se comprueba por observación visual de las llamas de los mecheros). Los mecheros se colocan alrededor del recinto de ensayo según se indica en la figura 1. Los cuatro mecheros suponen un consumo total de unos 3,2 litros de propano por minuto. Pueden utilizarse otros mecheros y gases combustibles pero la velocidad de calentamiento debe ser la especificada en la figura 3. Independientemente del equipo utilizado, es necesario comprobar periódicamente la velocidad de calentamiento mediante tubos llenos de ftalato de dibutilo, según se indica en la figura 3.

1.6.1.3. *Desarrollo de los ensayos*

Cada ensayo se realiza hasta que el tubo esté fragmentado o el tubo se haya calentado durante 5 minutos. Si el ensayo produce la fragmentación del tubo en tres o más piezas, que en algunos casos pueden estar unidas entre sí por bandas estrechas de metal, según ilustra la figura 2, entonces se considera que el ensayo produce explosión. Un ensayo en que se produzcan menos fragmentos o no haya fragmentación se considera que no produce explosión.

▼B

Se hace primero una serie de tres ensayos con una placa de 6,0 mm de diámetro de orificio y, si no se obtienen explosiones, se hace una segunda serie de tres ensayos con una placa de 2,0 mm de diámetro de orificio. Desde el momento en que se produzca una explosión en cualquiera de las dos series de ensayos no es necesario seguir realizando ensayos.

1.6.1.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión en cualquiera de las dos series de ensayos.

1.6.2. **Sensibilidad mecánica (choque)**

1.6.2.1. *Equipo (figura 4)*

Las partes fundamentales de un equipo clásico de martinete son un bloque de acero fundido con base, yunque, columna, guías, pesos que caen, mecanismo de liberación y un soporte para las muestras. El yunque de acero (100 mm de diámetro por 70 mm de altura) se atornilla a la parte superior de un bloque de acero (230 mm de longitud por 250 mm de anchura por 200 mm de altura) con una base de fundición (450 mm de longitud por 450 mm de anchura por 60 mm de altura). En un soporte atornillado a la parte posterior del bloque de acero se fija la columna, hecha de tubo de acero estirado sin costuras. El aparato se fija con cuatro tornos a un bloque macizo de hormigón (de 60 × 60 × 60 cm) de forma que los raíles de guía sean absolutamente verticales y el peso caiga en caída libre. Pueden utilizarse pesos de 5 y 10 kg, de acero macizo. La cabeza de choque de cada peso está hecha de acero templado HRC 60 a 63 y tiene un diámetro mínimo de 25 mm.

La muestra problema se pone en un dispositivo de choque, formado por dos cilindros coaxiales de acero macizo, uno encima del otro, en un anillo de guía de acero en forma de cilindro hueco. Los cilindros de acero macizo deben tener 10 (-0,003, -0,005) mm de diámetro y 10 mm de altura, sus superficies deben estar pulidas, los bordes redondeados (0,5 mm de radio de curvatura) y su dureza debe ser de HRC 58 a 65. El cilindro hueco debe tener 16 mm de diámetro exterior, un orificio pulido de 10 (+ 0,005, + 0,010) mm y 13 mm de altura. El dispositivo de choque se monta sobre un yunque intermedio (26 mm de diámetro y 26 mm de altura) hecho de acero y centrado por un anillo con perforaciones que dejen escapar los humos.

1.6.2.2. *Condiciones de ensayo*

El volumen de muestra debe ser de 40 $mm^3$, o bien un volumen adecuado para otro tipo de aparato alternativo. Las sustancias sólidas deben someterse a ensayo en estado seco y prepararse de la forma siguiente:

a) las sustancias en polvo se pasan por tamiz de 0,5 mm; para las pruebas se usa la fracción que haya atravesado el tamiz;

b) las sustancias prensadas, fundidas o condensadas de alguna otra forma se trituran en fragmentos pequeños y se tamizan; la fracción de diámetro comprendido entre 0,5 y 1 mm es la que se utiliza para los ensayos y debe ser representativa de la sustancia original.

Las sustancias normalmente suministradas como pastas se someterán a ensayos en el estado más seco posible o en algún caso, suprimiendo al máximo posible la cantidad de diluyente. Las sustancias líquidas se estudiarán dejando una separación de 1 mm entre el cilindro de acero superior y el inferior.

▼B

1.6.2.3. *Desarrollo de los ensayos*

Se ejecuta una serie de seis ensayos dejando caer la masa de 10 kg desde la altura de 0,40 m (40 J). Si se obtiene alguna explosión en esta serie de 40 J, hay que realizar otra serie de seis ensayos, dejando caer la masa de 5 kg desde la altura de 0,15 m (7,5 J). En otros equipos, se compara la muestra con la sustancia de referencia elegida según un procedimiento establecido (por ejemplo, técnica de subida y bajada, etc.).

1.6.2.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión (una inflamación y/o una detonación es equivalente a una explosión) al menos una vez en cualquiera de los ensayos con el equipo de choque especificado o si la muestra es más sensible que el 1,3-dinitrobenceno o el RDX en un ensayo de choque alternativo.

1.6.3. **Sensibilidad mecánica (fricción)**

1.6.3.1. *Equipo (figura 5)*

El equipo para el ensayo de fricción consiste en una base de acero fundido sobre la que se monta el dispositivo de fricción. Este consiste en una espiga fija de porcelana y un plato de porcelana móvil. El plato de porcelana se fija a una corredera que se desplaza sobre dos rieles. La corredera se conecta a un motor eléctrico por medio de una barra de conexión, una leva y un engranaje de transmisión adecuado, de forma que el plato de porcelana se desplace una sola vez hacia atrás y hacia adelante por debajo de la espiga de porcelana a lo largo de 10 mm. La espiga de porcelana puede cargarse, por ejemplo, con 120 o 360 N.

Los platos planos de porcelana están hechos de porcelana técnica blanca (rugosidad entre 9 y 32 μm) y sus dimensiones son 25 mm de longitud, 25 mm de anchura y 5 mm de altura. La espiga cilíndrica de porcelana también es de porcelana técnica blanca, mide 15 mm de longitud y 10 mm de diámetro y sus superficies extremas son esféricas y rugosas, con un radio de curvatura de 10 mm.

1.6.3.2. *Condiciones de los ensayos*

El volumen de la muestra debe ser de 10 $mm^3$, o bien un volumen adecuado para otro tipo de aparato alternativo.

Las sustancias sólidas se someten a ensayo en estado seco y se preparan de la forma siguiente:

a) las sustancias en polvo se pasan por tamiz de 0,5 mm; para las pruebas se utiliza toda la fracción que haya atravesado el tamiz;

b) las sustancias prensadas, fundidas o condensadas de alguna otra forma se trituran en fragmentos pequeños y se tamizan; para los ensayos se utiliza la fracción de diámetro inferior a 0,5 mm.

Las sustancias normalmente suministradas como pastas se someterán a ensayos en el estado más seco posible. Si la sustancia no puede ser preparada en estado seco, la pasta (suprimiendo al máximo posible la cantidad de diluyente) es sometida a ensayo en forma de película de 0,5 mm de espesor, 2 mm de anchura y 10 mm de longitud, preparada con una plantilla.

▼B

1.6.3.3. *Desarrollo de los ensayos*

Se pone sobre la muestra la espiga de porcelana y se aplica la carga. Al realizar el ensayo, las marcas esponjosas del plato de porcelana deben ser transversales a la dirección del movimiento. Hay que vigilar para que la espiga se apoye en la muestra, que haya bastante sustancia problema bajo la espiga y que el plato se mueva correctamente bajo la espiga. En el caso de sustancias pastosas, para aplicar la sustancia al plato se utiliza un dosificador de 0,5 mm de espesor con una ranura de 2 × 10 mm. El plato de porcelana tiene que desplazarse 10 mm hacia adelante y hacia atrás bajo la espiga en el plazo de 0,44 segundos. Cada parte de la superficie del plato y de la espiga debe utilizarse solo una vez; los dos extremos de cada espiga sirven para dos ensayos y cada una de las dos superficies de un plato sirve para tres ensayos.

Se ejecuta una serie de seis pruebas con una carga de 360 N. Si se obtiene algún resultado positivo durante estas seis pruebas, hay que realizar otra serie de seis pruebas con una carga de 120 N. En otros equipos, se compara la muestra con la sustancia de referencia elegida mediante un procedimiento establecido (por ejemplo, técnica de subida y bajada, etc.).

1.6.3.4. *Evaluación*

El resultado del ensayo se considera positivo si se produce una explosión (una crepitación y/o una detonación o una inflamación equivale a una explosión) al menos una vez en cualquiera de las pruebas con el equipo especificado de fricción o si se satisfacen los criterios equivalentes de otro ensayo alternativo de fricción.

2. **RESULTADOS**

En principio, se considera que una sustancia presenta peligro de explosión en el sentido de la Directiva si se obtiene un resultado positivo en el ensayo de sensibilidad térmica, al choque o a la fricción.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

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

— identidad, composición, pureza, grado higrométrico, etc., de la sustancia que se somete a ensayo,

— forma física de la muestra y si se ha triturado, fragmentado o tamizado,

— observaciones durante los ensayos de sensibilidad térmica (por ejemplo, masa de la muestra, número de fragmentos, etc.),

— observaciones durante los ensayos de sensibilidad mecánica (por ejemplo, formación de cantidades considerables de humo o descomposición completa sin detonación, llamas, chispas, crepitación, etc.),

— resultado de cada tipo de ensayo,

— si se ha utilizado otro aparato alternativo, hay que indicar la justificación científica de dicha utilización, así como las pruebas de correlación entre los resultados obtenidos con el aparato especificado y los obtenidos con aparatos equivalentes,

▼B

— cualquier observación que se considere útil, por ejemplo, referencia a ensayos realizados con productos similares, que puedan ser importantes para la interpretación correcta de los resultados,

— cualquier otra observación importante para la interpretación de los resultados.

3.2. INTERPRETACIÓN Y EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

El informe debe indicar los resultados que se consideren erróneos, anormales o no representativos. Cuando se rechace un resultado, se facilitará una explicación y se indicarán los resultados del ensayo sustitutivo o complementario. Si un resultado anormal no pudiera explicarse, se deberá aceptar el valor obtenido y se utilizará para clasificar la sustancia en consecuencia.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods: Tests and criteria, 1990, Naciones Unidas, Nueva York.

(2) Bretherick, L., Handbook of Reactive Chemical Hazards, 4th edition, Butterworths, Londres, ISBN 0-750-60103-5, 1990.

(3) Koenen, H., Ide, K.H. y Swart, K.H., Explosivstoffe, 1961, vol. 3, 6-13 y 30-42.

(4) NF T 20-038 (Sept. 85). Chemical products for industrial use — Determination of explosion risk.

▼B

*Apéndice*

**Ejemplo de especificación de material para el ensayo de sensibilidad térmica (véase DIN 1623)**

(1) Tubo: especificación de material nº 1.0336.505 g

(2) Placa horadada: especificación de material nº 1.4873

(3) Tuerca y abrazadera de rosca: especificación de material nº 1.3817

*Figura 1*

**Equipo para el ensayo de sensibilidad térmica**

(dimensiones en milímetros)

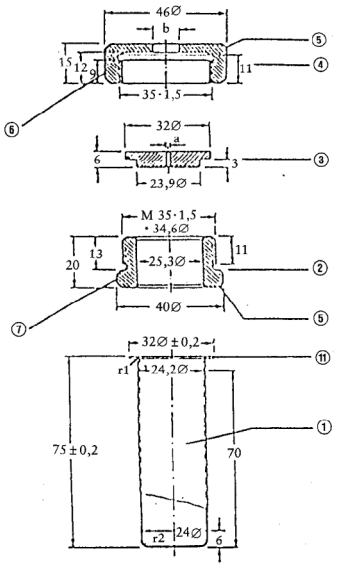



Figura 1a Tubo de acero y accesorios

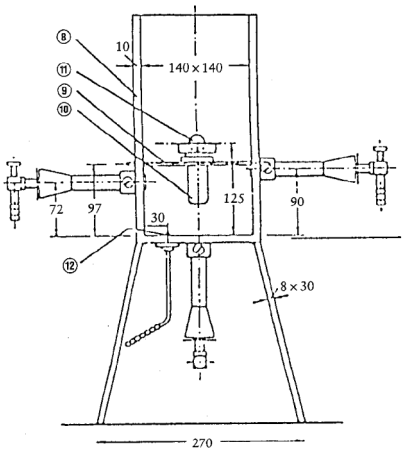



Figura 1b Instrumento de calefacción y protección

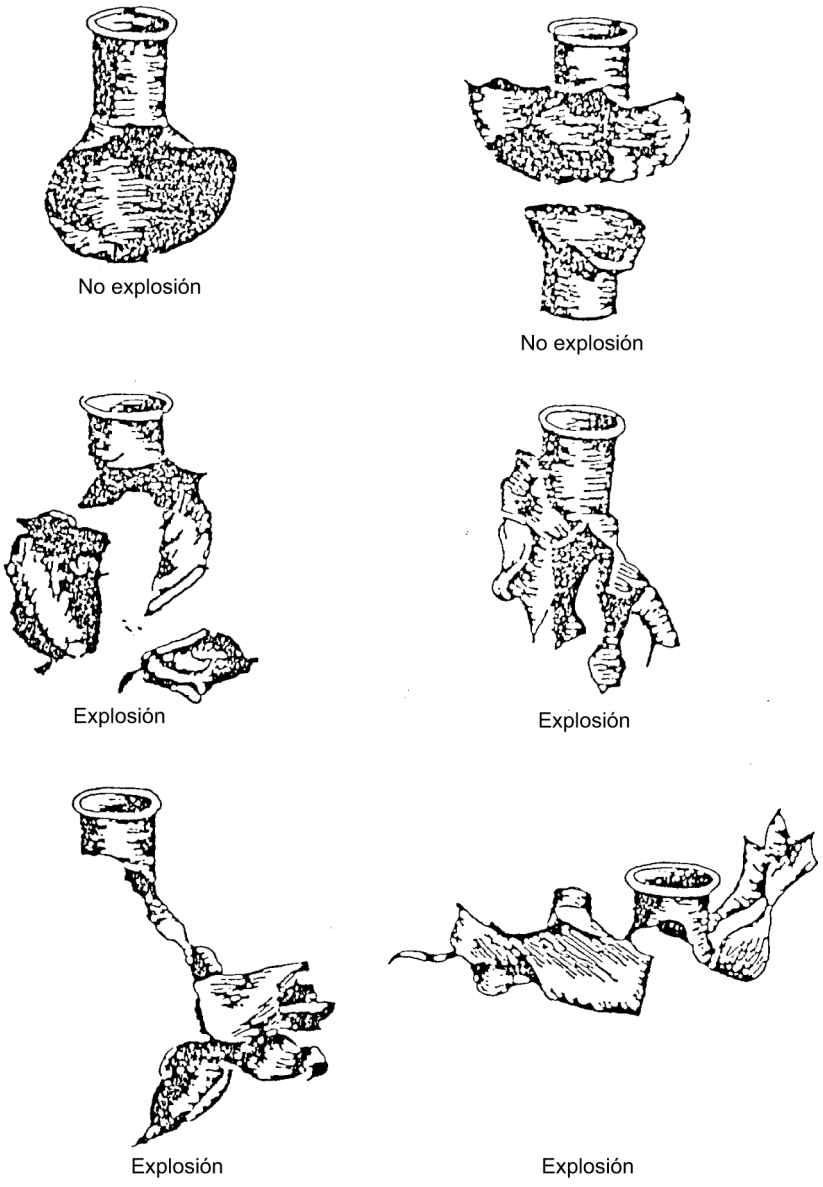
1 = Tubo
1a = Reborde
2 = Abrazadera de rosca; rosca de baja fricción
3 = Placa horadada a = 2,0 o 6,0 mm de diámetro
4 = Tuerca b = 10 mm de diámetro
5 = Chaflán
6 = Dos bateas para llave del 41
7 = Dos bateas por llave del 36
8 = Recinto inastillable
9 = Dos barras para sujetar el tubo
10 = Tubo montado
11 = Posición del mechero trasero, los otros mecheros son visibles en la figura
12 = Llama piloto

▼B

*Figura 2*

**Ensayo de sensibilidad térmica**

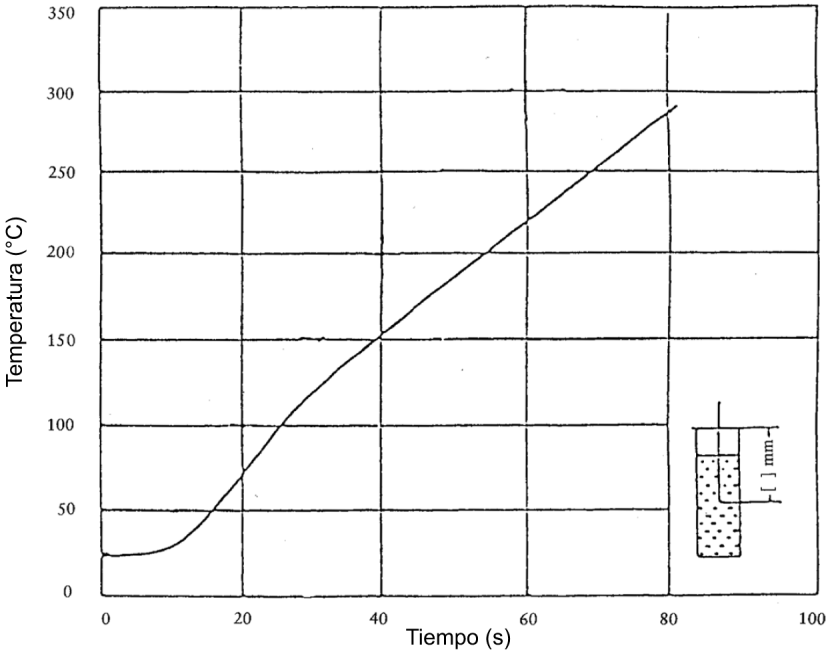
Ejemplos de fragmentación



▼B

*Figura 3*

**Calibración de la velocidad de calentamiento en el ensayo de sensibilidad térmica**




Curva temperatura/tiempo obtenida al calentar ftalato de dibutilo (27 $cm^3$) en un tubo cerrado (placa con orificio de 1,5 mm) utilizando un caudal de propano de 3,2 l/min. La temperatura se mide con un termopar de 1 mm de diámetro de alumel/cromel revestido de acero inoxidable, situado en el centro a 43 mm por debajo del borde del tubo. La velocidad de calentamiento entre 135 $^oC$ y 285 $^oC$ debe estar entre 185 y 215 K/min.

▼B

*Figura 4*

**Equipo del ensayo de choque**

**(dimensiones en milímetros)**

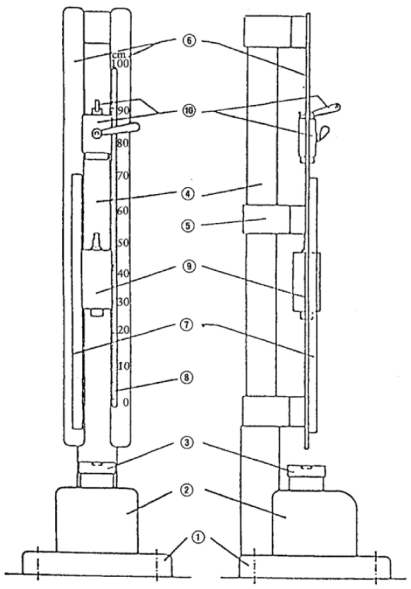



Figura 4a Martinete, vista general frontal y lateral

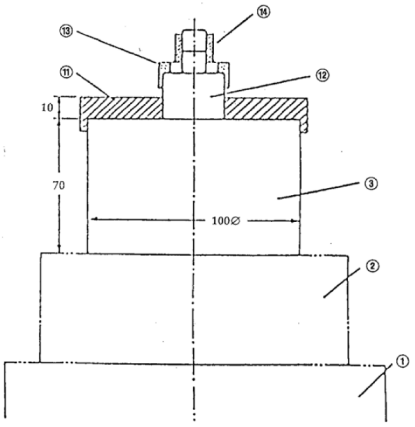



Figura 4b Martinete, parte inferior

1 = Base, 450 x 450 x 60
2 = Bloque de acero 230 x 250 x 200
3 = Yunque, 100 diámetro x 70
4 = Columna
5 = Travesaño medio
6 = 2 raíles
7 = Soporte dentado
8 = Escala graduada
9 = Martinete (masa que cae)
10 = Instrumento de sujeción y liberación
11 = Placa de sujeción
12 = Yunque intermedio (intercambiable), 26 diámetro x 26
13 = Anillo de sujeción con orificios
14 = Dispositivo de choque

▼B

*Figura 4*

**Continuación**

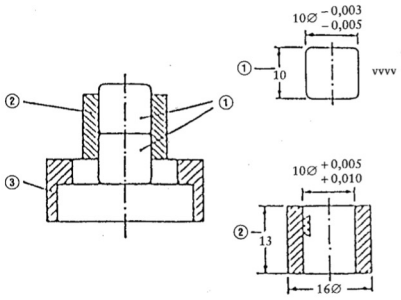



Figura 4c Dispositivo de choque para sustancias en polvo o pastosas

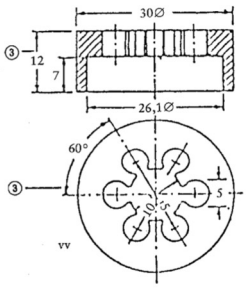
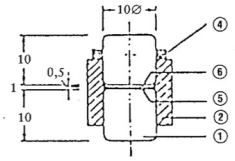



Figura 4d Dispositivo de choque para sustancias líquidas

1 = Cilindros de acero
2 = Anillo de guía para los cilindros de acero
a) sección vertical
b) planta
4 = Arandela de caucho
5 = Sustancia líquida (40 $mm^3$)
6 = Espacio libre de líquido



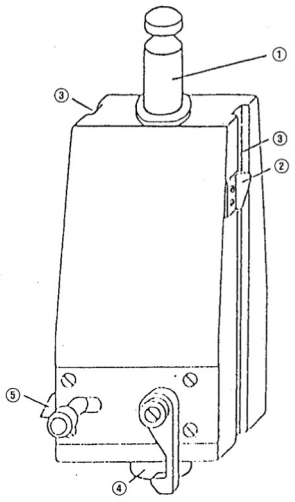



Figura 4e Martillo (masa de 5 kg)

1 = Espiga de suspensión
2 = Marcador de altura
3 = Ranura de colocación
4 = Cabeza cilíndrica de choque
5 = Pestillo contra el rebote

▼B

*Figura 5*

**Equipo de sensibilidad a la fricción**

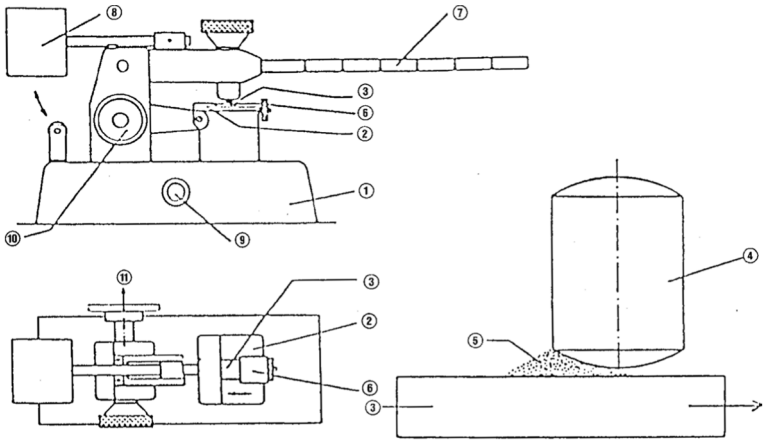



Figura 5a Equipo de fricción: vista de frente y planta

1 = Base de acero
2 = Corredera móvil
3 = Plato de porcelana, 25 X 25 x 5 mm, sujeto a la corredera
4 = Espiga fija de porcelana 10 diámetro X 15 mm
5 = Muestra problema, unos 10 $mm^3$

Figura 5b Posición inicial de la espiga sobre la muestra

6 = Soporte de la espiga
7 = Brazo de carga
8 = Contrapeso
9 = Interruptor
10 = Rueda para situar la corredera en la posición inicial
11 = Al motor eléctrico

▼B

## A.15. TEMPERATURA DE AUTOINFLAMACIÓN (LÍQUIDOS Y GASES)

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

No deben someterse a este ensayo las sustancias explosivas ni las que empiecen a arder espontáneamente en contacto con el aire a temperatura ambiente. El procedimiento de ensayo es aplicable a gases, líquidos y vapores que, en presencia de aire, puedan inflamarse por el contacto con una superficie caliente.

La temperatura de autoinflamación puede reducirse considerablemente por la presencia de impurezas catalíticas, por el material de la superficie o por un mayor volumen del recipiente de ensayo.

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El grado de autoinflamabilidad se expresa en términos de temperatura de autoinflamación. La temperatura de autoinflamación es la temperatura más baja a la que se inflama la sustancia problema, en presencia del aire y en las condiciones definidas por el método de ensayo.

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Las sustancias de referencia se citan en las normas (véase el punto 1.6.3). Sirven fundamentalmente para comprobar las características del método de vez en cuando y para poder comparar con los resultados obtenidos según otros métodos.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El método determina la temperatura mínima de la superficie interna de un recinto que provoca la inflamación de un gas, vapor o líquido inyectado en el recinto.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La repetibilidad varía según el intervalo de temperatura de autoinflamación y el método de ensayo utilizado.

La sensibilidad y la especificidad dependen del método de ensayo utilizado.

#### 1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

##### 1.6.1. **Equipo**

El equipo se describe en el método que se indica en el punto 1.6.3.

##### 1.6.2. **Condiciones del ensayo**

Se somete a ensayo una muestra de la sustancia problema según el método indicado en el punto 1.6.3.

##### 1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

Véanse las normas CEI-79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056 y NF T 20-037.

▼B

2. **RESULTADOS**

Registrar la temperatura de ensayo, la presión atmosférica, la cantidad de muestra utilizada y el intervalo de tiempo que transcurre hasta que se produce la inflamación.

3. **INFORME**

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

— especificación precisa de la sustancia (identificación e impurezas),

— cantidad de muestra utilizada, presión atmosférica,

— equipo utilizado,

— resultados de las medidas (temperaturas de ensayo, resultados relativos a la inflamación, intervalos de tiempo correspondientes),

— cualquier observación complementaria que pueda ser útil para la interpretación de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

Ninguna.

▼B

A.16. **TEMPERATURA RELATIVA DE AUTOINFLAMACIÓN DE SÓLIDOS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Las sustancias explosivas y las sustancias que se inflaman espontáneamente en contacto con el aire a temperatura ambiente no deben someterse a este ensayo.

El objetivo del ensayo es proporcionar datos preliminares sobre la autoinflamabilidad de las sustancias sólidas a altas temperaturas.

Si el calor producido, bien por reacción de la sustancia con el oxígeno o bien por descomposición exotérmica, no se disipa con la suficiente rapidez en el ambiente, el autocalentamiento ocasiona la autoinflamación. La autoinflamación se produce, en consecuencia, cuando la velocidad de producción de calor sobrepasa la velocidad de disipación.

El procedimiento es útil como ensayo de selección preliminar para las sustancias sólidas. Teniendo en cuenta la naturaleza compleja de la inflamación y de la combustión de los sólidos, la temperatura de autoinflamación determinada según este método solo debe servir para hacer comparaciones.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La temperatura de autoinflamación, tal como se determina por este método, es la temperatura ambiente mínima, expresada en grados centígrados ($^{o}$C), a la que se inflama cierto volumen de una sustancia en condiciones definidas.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se coloca un volumen definido de la sustancia problema en un horno a temperatura ambiente; se registra la curva de temperatura en el centro de la muestra frente al tiempo, elevando la temperatura del horno hasta 400 $^{o}$C o hasta el punto de fusión, si este es menor, a razón de 0,5 $^{o}$C por minuto. La temperatura del horno a la que la temperatura de la muestra alcanza los 400 $^{o}$C por autocalentamiento es la que, a fines del presente ensayo, se denomina temperatura de autoinflamación.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Equipo**

1.6.1.1. *Horno*

Horno de laboratorio con temperatura programable (volumen: unos 2 litros) equipado con circulación natural de aire y una válvula de explosión. Se debe evitar que los gases de descomposición entren en contacto con las resistencias eléctricas para evitar cualquier peligro de explosión.

▼B

1.6.1.2. *Cubo de tela de alambre*

Siguiendo el modelo de la figura 1, se corta un pedazo de tela metálica de acero inoxidable con abertura de 0,045 mm. Se dobla la tela metálica y se sujeta con alambre para formar un cubo abierto por la parte superior.

1.6.1.3. *Termopares*

Termopares apropiados.

1.6.1.4. *Registro*

Cualquier registro de dos canales, calibrado en el intervalo de 0 a 600 $^{o}$C o a una tensión correspondiente.

1.6.2. **Condiciones del ensayo**

El ensayo se efectúa con las sustancias tal y como se reciben.

1.6.3. **Desarrollo del ensayo**

Se llena el cubo con la sustancia problema, se comprime con cuidado y se añade más sustancia hasta llenar por completo el cubo. Se suspende este en el centro del horno a temperatura ambiente. Se coloca un termopar en el centro del cubo y otro entre el cubo y la pared del horno para registrar la temperatura de este último.

Las temperaturas del horno y de la muestra se registran continuamente elevando la temperatura del horno hasta los 400 $^{o}$C o hasta el punto de fusión del sólido, si este valor es menor, a razón de 0,5 $^{o}$C por minuto.

Cuando la sustancia se inflame, el termopar colocado en la muestra indicará una subida muy fuerte de la temperatura por encima de la temperatura del horno.

2. **RESULTADOS**

La temperatura del horno a la que la temperatura de la muestra alcanza los 400 $^{o}$C por autocalentamiento es significativa para la evaluación (véase la figura 2).

3. **INFORME**

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

— descripción de la sustancia problema,

— resultados de las medidas, incluida la curva de temperatura-tiempo,

— todas las observaciones complementarias que sean útiles para la interpretación de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

NF T 20-036 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the relative temperatura of the spontaneous flammability of solids.

▼B

*Figura 1*

**Modelo de cubo de ensayo de 20 mm**

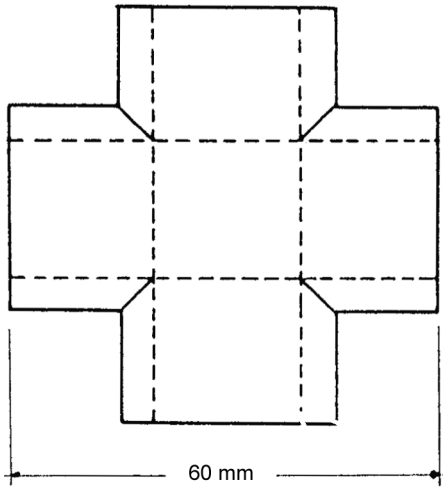
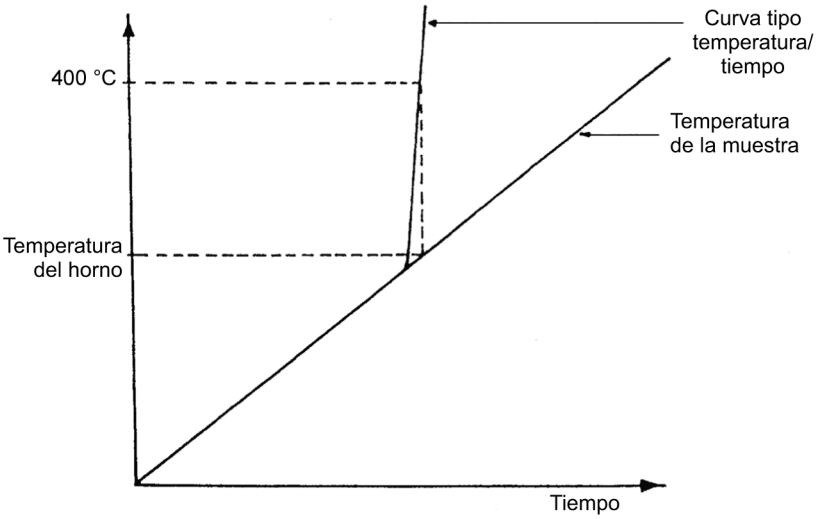



*Figura 2*

**Curva tipo temperatura/tiempo**



▼B

## A.17. PROPIEDADES COMBURANTES (SÓLIDOS)

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

Es conveniente disponer de información previa sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia antes de proceder al ensayo.

Este ensayo no es aplicable a líquidos, gases, sustancias explosivas o fácilmente inflamables ni a los peróxidos orgánicos.

Este ensayo es innecesario cuando el examen de la estructura química ponga de manifiesto que la sustancia no puede dar reacción exotérmica con un combustible.

Para saber si en este ensayo hay que tomar precauciones especiales, debe efectuarse una prueba preliminar.

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo de combustión: tiempo de reacción, expresado en segundos, necesario para que la zona de reacción se propague a través de la pila, según el procedimiento descrito en el punto 1.6.

Velocidad de combustión: expresada en milímetros por segundo.

Velocidad máxima de combustión: el valor más elevado entre las velocidades de combustión obtenidas con mezclas que contengan desde un 10 a un 90 % en peso de oxidante.

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Como sustancia de referencia se utiliza nitrato de bario (de grado analítico) tanto para el ensayo como para el ensayo preliminar.

La mezcla de referencia es la mezcla compuesta por nitrato de bario y celulosa en polvo, preparada según lo indicado en el punto 1.6, que tiene la velocidad máxima de combustión (se trata, generalmente, de una muestra con un 60 % en peso de nitrato de bario).

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Por razones de seguridad se procede a un ensayo preliminar. Este ensayo será, por sí solo, suficiente si durante el mismo se observa claramente que la sustancia problema tiene propiedades comburantes. En caso contrario, la sustancia deberá someterse al ensayo completo.

Para efectuar este ensayo completo se mezclan en proporciones variables la sustancia problema y un combustible definido. Con cada una de las mezclas se forma una pila y esta se enciende por un extremo. La velocidad máxima de combustión observada se compara con la velocidad máxima de combustión de la mezcla de referencia.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Cualquier método de trituración y de mezcla que deba emplearse será válido siempre que la diferencia entre la velocidad máxima de combustión en los seis ensayos y la media aritmética no sobrepase el 10 %.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Preparación**

1.6.1.1. *Sustancia problema*

Con el fin de obtener una granulometría inferior a 0,125 mm, se somete la muestra al siguiente procedimiento: se tamiza, se tritura la parte que quede y se tamiza de nuevo, repitiendo la operación hasta que toda la muestra haya pasado por el tamiz.

Para triturar y tamizar puede utilizarse cualquier método, siempre que se cumplan los criterios de calidad requeridos.

Antes de hacer la mezcla se desecará la muestra a 105 °C hasta obtener peso constante. Si la temperatura de descomposición de la sustancia es inferior a 105 °C, se secará a una temperatura inferior adecuada.

1.6.1.2. *Combustible*

El combustible es celulosa en polvo, del tipo utilizado en cromatografía en capa fina y en columna. Se considera adecuada una celulosa en la que la longitud de más del 85 % de las fibras esté comprendida entre 0,020 y 0,075 mm. El polvo de celulosa se tamiza con una malla de 0,125 mm. Hay que usar el mismo lote de celulosa en todo el ensayo.

Antes de preparar la mezcla, hay que secar la celulosa a 105 °C hasta obtener el peso constante.

Si en el ensayo preliminar se utiliza serrín, se elegirá un serrín de madera blanda, que se pasará por un tamiz de 1,6 mm de malla, se mezclará bien y se secará a 105 °C durante 4 horas en capas de no más de 25 mm de espesor. Una vez enfriado, se debe guardar en un envase hermético, llenándolo lo más posible. Es preferible utilizar el serrín dentro de las 24 horas siguientes al secado.

1.6.1.3. *Fuente de ignición*

Debe utilizarse la llama fuerte de un mechero de gas (diámetro mínimo: 5 mm). Si se utiliza otra fuente de ignición (por ejemplo, si se hace el ensayo en atmósfera inerte) hay que dar su descripción y justificación.

1.6.2. **Desarrollo del ensayo**

*Nota:*

Las mezclas de comburante con celulosa o serrín deben considerarse potencialmente explosivas y tratarse con las debidas precauciones.

1.6.2.1. *Ensayo preliminar*

La sustancia secada se mezcla bien con celulosa o serrín seco, en una proporción en peso de 2 partes de sustancia problema por 1 parte de celulosa o serrín. Con la mezcla se forma una pila cónica de 3,5 cm de diámetro de base y 2,5 cm de altura, llenando sin comprimir un molde cónico (por ejemplo, un embudo de laboratorio de cristal con el vástago tapado).

▼B

La pila se coloca sobre una superficie fría, incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica. El ensayo debe realizarse bajo una campana extractora (véase el punto 1.6.2.2).

La fuente de ignición se pone en contacto con el cono. Se observan y se anotan la intensidad y la duración de la reacción resultante.

Si la reacción es intensa, se considerará que la sustancia es comburante.

Cuando existan dudas respecto al resultado, será necesario efectuar el ensayo completo que se describe a continuación.

1.6.2.2. *Ensayo completo*

Se preparan mezclas de comburante y de celulosa que contengan de un 10 a un 90 % en peso de comburante, en incrementos del 10 %. Para los casos límite, hay que utilizar mezclas intermedias de comburante y celulosa para determinar la velocidad máxima de combustión con más precisión.

Se forma la pila con ayuda de un molde metálico de sección triangular de 250 mm de longitud, 10 mm de altura interior y 20 mm de anchura interior. A ambos lados de este molde se colocan en sentido longitudinal dos placas metálicas puestas como topes laterales que sobrepasen en 2 mm el borde superior de la sección triangular (véase la figura). Este montaje se llena, sin apretar, con un ligero exceso de mezcla. Después de haber dejado caer una vez el molde desde una altura de 2 cm sobre una superficie dura, se elimina la materia sobrante por medio de una lámina sostenida oblicuamente. Se quitan entonces los topes laterales y se aplana la superficie del polvo con ayuda de un rodillo. Se pone entonces sobre el molde una placa incombustible, no porosa y de baja conductividad térmica, se da la vuelta al conjunto y se quita el molde.

Se pone la pila en el tiro de una campana de gases.

Durante el ensayo, la velocidad de aspiración debe ser constante y suficiente para evitar que los humos se expandan por el laboratorio. Alrededor del aparato se coloca un cortaviento.

Dadas las propiedades higroscópicas de la celulosa y de algunas sustancias problema, el ensayo debe efectuarse lo más rápidamente posible.

Se enciende un extremo de la pila aplicándole la llama.

Se mide el tiempo de reacción sobre 200 mm después de que la zona de reacción haya recorrido una distancia inicial de 30 mm.

El ensayo se realiza con la sustancia de referencia y, por lo menos una vez, con cada una de las mezclas de sustancia problema con celulosa.

Si se observa una velocidad máxima de combustión significativamente mayor que la de la mezcla de referencia, puede detenerse el ensayo; si no es así, se repetirá de nuevo cinco veces con cada una de las tres mezclas que hayan dado las velocidades de combustión más elevadas.

▼B

Si se sospecha que el resultado es un falso positivo, hay que repetir el ensayo con una sustancia inerte que presente un tamaño de partícula similar, como el kieselguhr, en lugar de la celulosa. Otra posibilidad es someter a ensayo en atmósfera inerte (< 2 % v/v de oxígeno) la mezcla sustancia problema/celulosa que haya dado la mayor velocidad de combustión.

2. **RESULTADOS**

Por razones de seguridad, la velocidad máxima de combustión, en lugar de la media, será considerada como la propiedad comburante característica de la sustancia examinada.

En la evaluación se tendrá en cuenta la velocidad de combustión más elevada medida en una serie de seis ensayos con una mezcla dada.

Se representa gráficamente la velocidad de combustión más elevada de cada mezcla en función del contenido en comburante. La velocidad máxima de combustión se obtiene a partir de la gráfica.

Las seis velocidades de combustión medidas en una serie con la mezcla que haya dado la velocidad máxima de combustión, no deben diferir en más de 10 % de la media aritmética. En caso contrario, se deberán mejorar los métodos de trituración y mezcla.

Se compara la velocidad máxima de combustión obtenida con la velocidad máxima de combustión de la mezcla de referencia (véase el punto 1.3).

Si se hacen ensayos en atmósfera inerte, se comparará la velocidad máxima de reacción con la de la mezcla de referencia en atmósfera inerte.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

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

— identidad, composición, pureza, humedad, etc., de la sustancia problema,

— cualquier tratamiento a que se haya sometido la muestra (por ejemplo, triturado o secado),

— fuente de ignición utilizada en los ensayos,

— resultados de las medidas,

— tipo de reacción (por ejemplo: combustión rápida superficial, combustión en toda la masa, cualquier observación que se refiera a los productos de combustión, etc.),

— cualquier otra observación que resulte de utilidad para la interpretación de los resultados, incluida una descripción de la intensidad (llama, chispa, humo, combustión lenta sin llama, etc.) y la duración aproximada de la reacción observada durante el ensayo preliminar de seguridad/selección para la sustancia problema y la sustancia de referencia,

— resultado de los ensayos con una sustancia inerte, en su caso,

— resultado de los ensayos en atmósfera inerte, en su caso.

▼B

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se considerará que una sustancia es comburante si:

a) hay una reacción intensa en el ensayo preliminar;

b) durante el ensayo completo la velocidad máxima de combustión de las mezclas problema es superior o igual a la de la mezcla de referencia formada por celulosa y nitrato de bario.

A fin de evitar los falsos positivos, a la hora de interpretar los resultados también habrá que tener en cuenta los valores obtenidos al estudiar la sustancia problema mezclada con material inerte o en atmósfera inerte.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

NF T 20-035 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the oxidizing properties of solids.

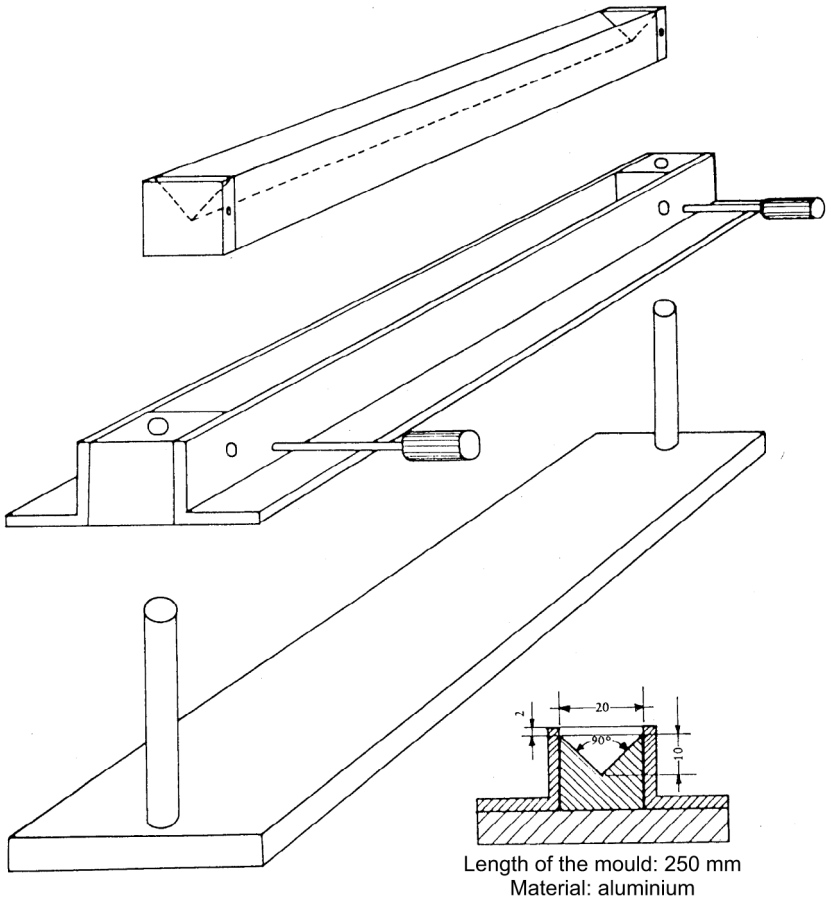
▼B

*Apéndice*

*Figura*

**Molde y accesorios necesarios para formar las pilas**

(rodas las dimensiones expresadas en milímetros)



▼B

## A.18. PESO MOLECULAR MEDIO EN NÚMERO Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PESOS MOLECULARES DE LOS POLÍMEROS

### 1. MÉTODO

Este método de cromatografía de permeación sobre gel (CPG) es copia de las directrices TG 118 de la OCDE (1996). Los principios fundamentales y demás información técnica se dan en la referencia 1.

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de las propiedades de los polímeros impide describir un único método que fije precisamente las condiciones de separación y de evaluación que cubran todas las eventualidades y particularidades que se producen en la separación de los polímeros. En particular, es frecuente que los polímeros complejos no puedan someterse a la CPG. En este caso, puede determinarse el peso molecular diferentemente (véase el anexo). Deberán entonces indicarse todos los datos y la justificación del método utilizado.

El método descrito aquí se basa en la norma DIN 55672 (1). Se encontrará en esta norma DIN información precisa sobre la manera de llevar a cabo las pruebas y de evaluar los datos. Cuando sea indispensable introducir modificaciones de las condiciones experimentales, estos cambios deberán justificarse. Se podrán utilizar otras normas con las debidas referencias. El método descrito utiliza para la calibración muestras de poliestireno de polidispersidad conocida y puede ser necesario modificarlo para adaptarlo a algunos polímeros como, por ejemplo, los polímeros solubles en el agua o ramificados de cadena larga.

### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

El peso molecular medio en número $M_n$ y el peso molecular medio en peso $M_w$ se determinan con las siguientes ecuaciones:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

donde

$H_i$ = el nivel de la señal del detector a partir de la línea de base para el volumen de retención $V_i$

$M_i$ = el peso molecular de la fracción polimérica de volumen de retención $V_i$

n = el número de puntos de medición.

La amplitud de la distribución de los pesos moleculares, que caracteriza la dispersidad del sistema, viene dada por la relación $M_w/M_n$.

▼B

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Como la CPG es un método relativo, es necesario efectuar una calibración. Para eso, se utilizan normalmente patrones de poliestireno de distribución estrecha y estructura lineal cuyos pesos moleculares medios $M_n$ y $M_w$ se conocen, así como su distribución de pesos moleculares. La curva de calibración solo puede servir para determinar el peso molecular de la muestra desconocida si las condiciones de separación de la muestra y de los patrones se han seleccionado de manera idéntica.

Una relación determinada entre el peso molecular y el volumen de elución solo es válida en las condiciones específicas de una experiencia particular. Estas condiciones son, sobre todo, la temperatura, el disolvente (o la mezcla de disolventes), las condiciones de la cromatografía y la columna o sistema de columnas de separación.

Los pesos moleculares de la muestra, determinados de esta manera, son valores relativos y se describen como «pesos moleculares equivalentes de poliestireno». En otros términos, según las diferencias estructurales y químicas entre la muestra y los patrones, los pesos moleculares pueden más o menos desviarse de los valores absolutos. Si se recurre a otros patrones como, por ejemplo, de políetilenglicol, de polióxido de etileno, de polimetacrilato de metilo, de poliácido acrilico, se explicará esta elección.

I.4. PRINCIPIOS DEL MÉTODO DE ENSAYO

La distribución de pesos moleculares de la muestra y los pesos moleculares medios ($M_n$, $M_w$) pueden determinarse por CPG. La CPG es una cromatografía líquida particular en la cual la muestra se separa según los volúmenes hidrodinámicos de sus componentes (2).

La separación se efectúa mientras que la muestra pasa por una columna rellena de un material poroso, normalmente un gel orgánico. Las moléculas pequeñas consiguen penetrar en los poros, mientras que las gruesas quedan excluidas. El recorrido de las moléculas grandes es, pues, más corto y se eluyen antes. Las moléculas de tamaño medio penetran en algunos poros y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen al final.

En una situación ideal, la separación depende completamente del tamaño de las distintas moléculas, pero en la práctica es difícil evitar la interferencia de al menos algunos efectos de absorción. La situación empeora en caso de relleno irregular de la columna o de volúmenes muertos (2).

Se procede a la detección basándose, por ejemplo, en el índice de refracción o en la absorción UV para llegar a una curva de distribución simple. Sin embargo, para precisar sobre la curva valores efectivos de los pesos moleculares, es necesario calibrar la columna haciendo pasar polímeros de peso molecular conocido y, a ser posible, de estructura globalmente idéntica, por ejemplo, diversos patrones de poliestireno. Resulta de manera característica una curva de Gauss, a veces distorsionada por una pequeña cola hacia el lado de los pesos moleculares bajos; el eje vertical indica la cantidad, en peso, de las especies de distintos pesos moleculares eluídas, y el eje horizontal el logaritmo del peso molecular.

▼B

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La repetibilidad (desviación típica relativa: RSD) del volumen de elución deberá sobrepasar el 0,3 %. La repetibilidad requerida del análisis estará garantizada por corrección mediante patrón interno si se evalúa un cromatograma en función del tiempo y no corresponde al criterio previamente mencionado (1). Las polidispersidades dependen de los pesos moleculares de los patrones. En el caso de los patrones de poliestireno, los valores característicos son:

| | |
|---|---|
| $M_p < 2\,000$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |
| $2\,000 < M_p < 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}05$ |
| $M_p > 10^6$ | $M_w//M_n < 1{,}20$ |

($M_p$ es el peso molecular del patrón en el máximo del pico)

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. **Preparación de las soluciones patrón de poliestireno**

Se disuelven los patrones de poliestireno mezclándolos cuidadosamente con el eluyente elegido. Se tendrán en cuenta las recomendaciones del fabricante para la preparación de las soluciones.

Las concentraciones de los patrones elegidos dependen de distintos factores como, por ejemplo, el volumen de inyección, la viscosidad de la solución y la sensibilidad del detector analítico. El volumen máximo de inyección debe adaptarse a la longitud de la columna, con el fin de evitar las sobrecargas. Generalmente, los volúmenes inyectados para las separaciones analíticas por CPG en una columna de 30 cm × ~ 7,8 mm se sitúan entre 40 y 100 ul. Es posible utilizar volúmenes mayores, pero no deben sobrepasar los 250 ul. La relación óptima entre el volumen de inyección y la concentración debe determinarse antes de la calibración efectiva de la columna.

1.6.2. **Preparación de la solución de muestra**

En principio, las mismas exigencias se aplican a la preparación de las soluciones de muestras. La muestra se disuelve en un disolvente conveniente como, por ejemplo, tetrahidrofurano (THF), agitando con cuidado. No debe nunca disolverse en baño de ultrasonidos. En caso necesario, la solución de muestra se purifica con un filtro de membrana cuyo tamaño de poro se sitúa entre 0,2 y 2 μm.

Debe señalarse en el informe final la presencia de partículas no disueltas, puesto que puede tratarse de sustancias de elevado peso molecular. Se utilizará un método conveniente para determinar el porcentaje en peso de partículas no disueltas. Las disoluciones se utilizarán en el plazo de 24 horas.

1.6.3. **Equipo**

— Depósito de disolvente.

— Desgasificador (en su caso).

— Bomba.

▼B

— Amortiguador de pulsaciones (en su caso).

— Sistema de inyección.

— Columnas de cromatografía.

— Detector.

— Caudalímetro (en su caso).

— Conjunto de registro-tratamiento de los datos.

— Receptáculo de residuos.

Es necesario garantizar que el sistema de CPG es inerte respecto a los disolventes utilizados (por ejemplo, utilizando capilares de acero para el disolvente THF).

1.6.4. **Sistema de inyección y de distribución del disolvente**

Un volumen definido de la solución de muestra se pasa a la columna con ayuda de un muestreador automático o bien manualmente, en una zona estrictamente definida. La liberación o la depresión manual demasiado rápida del émbolo de la jeringuilla pueden causar modificaciones en la distribución de pesos moleculares observada. El sistema de distribución del disolvente deberá, en la medida de lo posible, estar libre de pulsaciones, y lo ideal es que incluya un amortiguador de pulsaciones. El caudal es del orden de 1 ml/min.

1.6.5. **Columna**

Según la muestra, el polímero se caracterizará con ayuda de una columna simple o de varias columnas conectadas en secuencia. Está disponible en el comercio diverso material para columnas porosas, de propiedades definidas (por ejemplo, tamaño de poro, límites de exclusión). La elección del gel de separación o de la longitud de la columna depende tanto de las propiedades de la muestra (volúmenes hidrodinámicos, distribución de los pesos moleculares) como de las condiciones específicas de la separación, como el disolvente, la temperatura y el caudal (1) (2) (3).

1.6.6. **Platos teóricos**

La columna (o la combinación de columnas) utilizada para la separación debe caracterizarse por el número de platos teóricos. En el caso de tomar el THF como disolvente de elución, es necesario cargar una solución de etilbenceno u otro soluto homopolar adecuado en una columna de longitud conocida. El número de platos teóricos viene dado por la siguiente ecuación:

$$N = 5{,}54 \left( \frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{o} \qquad N = 16 \left( \frac{V_e}{W} \right)^2$$

donde

$N$ = número de platos teóricos

$V_e$ = volumen de elución en el máximo del pico

▼B

W = anchura del pico en la línea de base

$W_{1/2}$ = lanchura del pico a la mitad de la altura.

1.6.7. **Capacidad de separación**

Además del número de platos teóricos, cantidad que determina la anchura de la banda, la capacidad de separación desempeña también un papel y está determinada por la pendiente de la curva de calibración. La capacidad de separación de una columna viene dada por la siguiente relación:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{superfície de la secció tranversal de la columna}} \geq 6{,}0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

donde

$V_{e,\ M_x}$ = volumen de elución de un poliestireno de peso molecular $M_x$

$V_{e(I0M_x)}$ = volumen de elución de un poliestireno de peso molecular diez veces superior.

La resolución del sistema se define generalmente deí siguiente modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

donde

$V_{el'}\ V_{e1}$ = volúmenes de elución de los dos patrones de poliestireno en el máximo del pico

$W_{1,}\ W_2$ = anchuras de los picos en la línea de base

$M_1,\ M_2$ = pesos moleculares en el máximo del pico (deberían diferir en un factor de 10)

El valor R del sistema de columna debería sobrepasar 1.7 (4),

1.6.8. **Disolvente**

Todos los disolventes deben ser de gran pureza (para el THF, se exigirá una pureza del 99,5 %). El depósito de disolvente (en caso necesario, en una atmósfera de gas inerte) debe ser suficientemente grande para la calibración de la columna y varios análisis de muestras. El disolvente debe desgasificarse antes de su transporte a la columna por la bomba.

1.6.9. **Ajuste de la temperatura**

La temperatura de los componentes internos esenciales (circuito de inyección, columnas, detector y conducciones) será constante y en coherencia con la elección del disolvente.

▼B

1.6.10. **Detector**

El detector tiene por objeto registrar cuantitativamente la concentración de muestra eluida de la columna. Para evitar el ensanchamiento inútil de los picos, el volumen de la célula del detector debe ser lo más bajo posible. No debería exceder de 10 µl excepto en caso de detectores de dispersión de luz y de viscosidad. La detección se hace generalmente por refractometría diferencial. Sin embargo, si alguna propiedad de la muestra o del disolvente de elución lo impone, se puede recurrir a otros tipos de detectores, como por ejemplo, detectores de UV/visible, IR, viscosidad, etc.

2. **RESULTADOS E INFORMES**

2.1. RESULTADOS

Hay que remitirse a la norma DIN (1) respecto al detalle de los criterios de evaluación así como para los imperativos relativos a la recogida y tratamiento de los datos.

De cada muestra, deben realizarse dos experiencias independientes, que será necesaria analizar separadamente.

$M_n$, $M_w$, $M_w/M_n$ y $M_p$ deben establecerse en cada medición. Es necesario indicar explícitamente que los valores medidos son valores relativos equivalentes a los pesos moleculares de los patrones utilizados.

Después de la determinación de los volúmenes de retención o del tiempo de retención (eventualmente corregidos con ayuda de un patrón interno), los valores log $M_p$ ($M_p$ es el máximo del pico del patrón de calibración) se representan gráficamente en función de una de esas cantidades. Serán necesarios al menos dos puntos de calibración por década de pesos moleculares y al menos cinco puntos de medida para la curva entera, que debe cubrir el peso molecular estimado de la muestra. El peso molecular más bajo de la curva de calibración se define por-el n-hexilbenceno u otro soluto homopolar adecuado. La media en número y la media en peso de los pesos moleculares se determinan generalmente por tratamiento informático de los datos, sobre la base de las fórmulas del punto 1.2. En caso de digitalización manual, se puede consultar el documento ASTM D 3536-91 (3).

La curva de distribución debe darse en forma de cuadro o de gráfico (frecuencia diferencial o porcentajes de las sumas frente al log M). Para la representación gráfica, una década de pesos moleculares debería normalmente ocupar unos 4 cm de anchura y el máximo del pico debería encontrarse a unos 8 cm de altura. En el caso de curvas de distribución integral, la diferencia de ordenadas entre 0 y 100 % debería ser de cerca de 10 cm.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

2.2.1. **Sustancia de ensayo**

— Información existente sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas).

▼B

— Descripción del tratamiento de la muestra, observaciones, problemas.

2.2.2. **Equipo**

— Depósito de eluyente, gas inerte, desgasificación del eluyente, composición del eluyente, impurezas.

— Bomba, amortiguador de pulsaciones, sistema de inyección.

— Columnas de separación (fabricante, toda la información sobre las características de las columnas como tamaño del poro, naturaleza del material de separación, etc., número, longitud y orden de las columnas utilizadas).

— Número de platos teóricos de la columna (o combinación), capacidad de separación (resolución del sistema).

— Información sobre la simetría de los picos.

— Temperatura de la columna, naturaleza del ajuste de la temperatura.

— Detector (principio de medida, volumen de la célula).

— Caudalímetro si se utiliza (fabricante, principio de medida).

— Sistema de registro y tratamiento de los datos (material y programas informáticos).

2.2.3. **Calibración del sistema**

— Descripción precisa del método empleado para construir la curva de calibración.

— Información sobre los criterios de calidad de este método (por ejemplo, coeficiente de correlación, suma de cuadrados de error, etc.).

— Explicaciones sobre todas las extrapolaciones, hipótesis y aproximaciones hechas durante el procedimiento experimental y la evaluación y tratamiento de los datos.

— Todas las medidas utilizadas para construir la curva de calibración deben precisarse en un cuadro que incluya la información siguiente de cada punto de calibración:

  — nombre de la muestra,

  — fabricante de la muestra,

  — valores característicos de los patrones $M_p$, $M_n$, $M_w$, $M_w/M_n$, proporcionados por el fabricante o derivados de medidas posteriores, junto con precisiones sobre el método de determinación,

  — volumen y concentración de inyección,

▼B

— valor de $M_p$ utilizado para la calibración,

— volumen de elución o tiempo de retención corregido medido en los máximos de los picos

— $M_p$ calculado en el máximo de los picos,

— error porcentual del $M_p$ calculado y del valor de calibración.

2.2.4. **Evaluación**

— Evaluación en función del tiempo: métodos utilizados para garantizar la reproducibilidad requerida (método de corrección, patrón interno, etc.).

— Información sobre si la evaluación se ha realizado basándose en el volumen de elución o en el tiempo de retención.

— Información sobre los límites de la evaluación si no se analiza completamente un pico.

— Descripción de los métodos de suavizado, si se utilizan.

— Procedimientos de preparación y de tratamiento preliminar de la muestra.

— Posible presencia de partículas no disueltas.

— Volumen de inyección (µl) y concentración de inyección (mg/ml).

— Observaciones sobre los efectos que llevan a divergencias en relación con el perfil ideal de la CPG.

— Descripción detallada de todas las modificaciones de los procedimientos de ensayo.

— Precisiones sobre las gamas de errores.

— Toda la información y observaciones pertinentes para la interpretación de los resultados.

3. **REFERENCIAS**

(1) DIN 55672 (1995). *Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrabydrofuran (THE) als Elutionsmittel,* Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds, (1979). *Modern Size Exclusión Liquid Cbromato- grapby,* J. Wiley and sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Cbromatography-GPC).* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystirene by High Performance Size-Exclusion Chromatography.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

*Anexo*

**Ejemplos de otros métodos de determinación del peso molecular promedio en número (M) de los polímeros**

La cromatografía por permeación sobre gel (CPG) es el método de elección para determinar $M_n$, en particular cuando se dispone de un conjunto de patrones que tienen una estructura comparable a la del polímero. Sin embargo, cuando surgen dificultades prácticas en la utilización de la CPG o si se espera por adelantado que la sustancia no cumpla algún criterio $M_n$ reglamentario (y que exija confirmación) existen otros métodos, por ejemplo:

1. **Utilización de las propiedades coligativas**

1.1. Ebulloscopia/crioscopia:

ponen en juego la medida de la subida del punto de ebullición (ebulloscopia) o del descenso del punto de congelación (crioscopia) de un disolvente, cuando se añade el polímero. El método se basa en el hecho de que el efecto del polímero disuelto sobre el punto de ebullición congelación del líquido depende del peso molecular del polímero (1) (2).

Aplicabilidad, $M_n < 20\,000$.

1.2. Descenso de la presión de vapor:

pone en juego la medida de la presión de vapor de un líquido de referencia determinado antes y después de la adición de cantidades conocidas de polímero (1) (2).

Aplicabilidad, $M < 20\,000$ (teóricamente, sin embargo, en la práctica, su valor es limitado).

1.3 Osmometría de membrana:

*se* basa en el principio de la osmosis, es decir, la tendencia natural de las moléculas de disolvente a atravesar una membrana semipermeable desde una solución diluida hacia una solución concentrada para llegar al equilibrio. En el ensayo, la solución diluida tiene una concentración cero, mientras que la solución concentrada contiene el polímero. El efecto del paso del disolvente a través de la membrana causa un diferencial de presión que depende de la concentración y del peso molecular del polímero (1) (3) (4).

Aplicabilidad, $M_n < 20\,000$ y $200\,000$.

1.4 Osmometría en fase de vapor:

compara la velocidad de evaporación de un aerosol de disolvente puro con al menos tres aerosoles que contiene el polímero a distintas concentraciones (l) (5) (6).

Aplicabilidad, $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Análisis de grupos terminales**

Para utilizar este método, es necesario conocer al mismo tiempo la estructura global del polímero v la naturaleza de los grupos terminales de las cadenas (que debe ser distinguible del esqueleto principal por, por ejemplo, RMN o valoración/derivación). La determinación de la concentración molecular de los grupos terminales presentes en el polímero permite determinar un valor del peso molecular (7) (8)

Aplicabilidad, $M_n$ hasta 50 000 (con fiabilidad decreciente).

3. **referencias**

(1) Billmeyer, F.W. Jr, (1984). *Textbook of Polymer Science,* 3rd Edn, John Viley, Nueva York.

(2) Glover, CA., (1975). «Absolute Colligative Property Methods». Chapter 4 In: *Polymer Molecular Weights,* Part I, P.E. Slade, Jr. ed, Marcel Dekker, Nueva York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). *Standard Practicc for Determination of Number-Average Molecular Wcight of Polymers by Membrane Osnwmetry.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989), «Membrane Osmometry. In: *Determination of Molecular Weight,* A.R. Cooper ed, I. W'iley and Sons. pp. 25-52».

(5) ASTM 3592-77, (19"). *Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure,* American Society íor Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989), «Vapour Pressure Osmometry-. In: *Determination of Molecular Weight,* A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons».

(7) Schröder, E., Müller, G., y Arndt, K-F., (1989). *Polymer Characterisation,* Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). «End-Group Determinations», Chapter 3 In: *Polymer Molecular Weights,* Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, Nueva York.

(9) Amiya, S, *et al.* (1990). *Pure and Applied Chemistry,* 62, 2139-2146.

▼B

A.19. **CONTENIDO DE SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR EN LOS POLÍMEROS**

1. **MÉTODO**

Este método de cromatografía de permeación sobre el gel (CPG) es copia de las directrices TG 119 de la OCDE (1996). Los principios fundamentales y demás información técnica se dan en la referencia 1.

1.1. INTRODUCCIÓN

La gran diversidad de las propiedades de los polímeros impide describir un único método que fije precisamente las condiciones de separación y de evaluación que cubran todas las eventualidades y particularidades que se producen en la separación de los polímeros. En particular, es frecuente que los polímeros complejos no puedan someterse a la CPG. En este caso, puede determinarse el peso molecular diferentemente (véase el anexo). Deberán entonces indicarse todos los datos y la justificación del método utilizado.

El método descrito aquí se basa en la norma DIN 55672 (1). Se encontrará en esta norma DIN información precisa sobre la manera de llevar a cabo las pruebas y de evaluar los datos. Cuando sea indispensable introducir modificaciones de las condiciones experimentales, estos cambios deberán justificarse. Se podrán utilizar otras normas con las debidas referencias. El método descrito utiliza para la calibración muestras de poliestireno de polidispersidad conocida y puede ser necesario modificarlo para adaptarlo a algunos polímeros como, por ejemplo, los polímeros solubles en el agua o ramificados de cadena larga.

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Un peso molecular bajo se define arbitrariamente como un peso molecular por debajo de 1 000 dalton.

El peso molecular medio en número $M_{ti}$ y el peso molecular medio en peso $M_w$ se determinan con las siguientes ecuaciones:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

donde

$H_i$ = nivel de la señal del detector a partir de la línea de base para el volumen de retención $V_i$

$M_i$ = peso molecular de la fracción polimérica de volumen de retención $V_i$ y n es el número de puntos de medición.

La amplitud de la distribución de los pesos moleculares, que caracteriza la dispersidad del sistema, viene dada por la relación $M_w/M_n$.

▼B

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Como la CPG es un método relativo, es necesario efectuar una calibración. Para eso, se utilizan normalmente patrones de poliestireno de distribución estrecha y estructura lineal cuyos pesos moleculares medios $M_n$ y $M_w$ se conocen, así como su distribución de pesos moleculares. La curva de calibración solo puede servir para determinar el peso molecular de la muestra desconocida si las condiciones de separación de la muestra y de los patrones se han seleccionado de manera idéntica.

Una relación determinada entre el peso molecular y el volumen de elución solo es válida en las condiciones específicas de una experiencia particular. Estas condiciones son, sobre todo, la temperatura, el disolvente (o la mezcla de disolventes), las condiciones de la cromatografía y la columna o sistema de columnas de separación,

Los pesos moleculares de la muestra, determinados de esta manera, son valores relativos y se describen como «pesos moleculares equivalentes de poliestireno». En otros términos, según las diferencias estructurales y químicas entre la muestra y los patrones, los pesos moleculares pueden más o menos desviarse de los valores absolutos. Si se recurre a otros patrones como, por ejemplo, de polietilenglícol, de polióxido de etileno, de polimetacrilato de metilo, de poliácido acrílico, se explicará esta elección.

1.4. PRINCIPIOS DEL MÉTODO DE ENSAYO

La distribución del peso molecular de la muestra y los pesos moleculares medios ($M_n$ y $M_w$) pueden determinarse por CPG. La CPG es una cromatografía líquida particular en la cual la muestra se separa según los volúmenes hidrodinámicos de sus componentes (2).

La separación se efectúa mientras que la muestra pasa por una columna rellena de un material poroso, normalmente un gel orgánico. Las moléculas pequeñas consiguen penetrar en los poros, mientras que las gruesas quedan excluidas. El recorrido de las moléculas grandes es, pues, más corto y se eluyen antes. Las moléculas de tamaño medio penetran en algunos poros y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen posteriormente. Las moléculas más pequeñas, con un radio hidrodinámico medio más pequeño que los poros del gel, pueden penetrar en todos ellos y se eluyen al final,

En una situación ideal, la separación depende completamente del tamaño de las distintas moléculas, pero en la práctica es difícil evitar la interferencia al menos de algunos efectos de absorción. La situación empeora en caso de relleno irregular de la columna o de volúmenes muertos (2).

Se procede a la detección basándose, por ejemplo, en el índice de refracción o en la absorción UV para llegar a una curva de distribución simple. Sin embargo, para precisar sobre la curva valores efectivos de los pesos moleculares, es necesario calibrar la columna haciendo pasar polímeros de peso molecular conocido y, a ser posible, de estructura globalmente idéntica, por ejemplo, diversos patrones de poliestireno. Resulta de manera característica una curva de Gauss, a veces distorsionada por una pequeña cola hacia el lado de los pesos moleculares bajos; el eje vertical indica la cantidad, en peso, de las especies de distintos pesos moleculares eluidas, y el eje horizontal el logaritmo del peso molecular.

▼B

El contenido en sustancias de bajo peso molecular se obtiene de esta curva. El cálculo solo puede ser preciso si las especies de peso molecular bajo responden del mismo modo, en función del peso, que el polímero en su conjunto.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La repetibilidad (desviación típica relativa: RSD) del volumen de elución deberá sobrepasar el 0,3 %. La repetibilidad requerida del análisis estará garantizada por corrección mediante patrón interno si se evalúa un cromatograma en función del tiempo y no corresponde al criterio previamente mencionado (1). Las polidispersidades dependen de los pesos moleculares de los patrones. En el caso de los patrones de poliestireno, ios valores característicos son.

| | |
|---|---|
| $M_p < 2\,000$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |
| $2\,000 \leq M_p \leq 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}05$ |
| $M_p > 10^6$ | $M_w/M_n < 1{,}20$ |

($M_p$ es el peso molecular del patrón en el máximo del pico)

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. **Preparación de las soluciones patrón de poliestireno**

Se disuelven los patrones de poliestireno mezclándolos cuidadosamente con el eluyente elegido. Se tendrán en cuenta las recomendaciones del fabricante para la preparación de las soluciones.

Las concentraciones de los patrones elegidos dependen de distintos factores como, por ejemplo, el volumen de inyección, la viscosidad de la solución y la sensibilidad del detector analítico. El volumen máximo de inyección debe adaptarse a la longitud de la columna, con el fin de evitar las sobrecargas. Generalmente, los volúmenes inyectados para las separaciones analíticas por CPG en una columna de 30 cm × 7,8 mm se sitúan entre 40 y 100 µl. Es posible utilizar volúmenes mayores, pero no deben sobrepasar 250 µl. La relación óptima entre el volumen de inyección y la concentración debe determinarse antes de la calibración efectiva de la columna.

1.6.2. **Preparación de la solución de muestra**

En principio, las mismas exigencias se aplican a la preparación de las soluciones de muestras. La muestra se disuelve en un disolvente conveniente como, por ejemplo, retrahidrofurano (THF), agitando con cuidado. No debe nunca disolverse en baño de ultrasonidos. En caso necesario, la solución de muestra se purifica con un filtro de membrana cuyo tamaño de poro se sitúa entre 0,2 y 2 µm.

Debe señalarse en el informe final la presencia de partículas no disueltas, puesto que puede tratarse de sustancias de elevado peso molecular. Se utilizará un método conveniente para determinar el porcentaje en peso de partículas no disueltas. Las disoluciones se utilizarán en el plazo de 24 horas.

▼B

1.6.3. **Corrección del contenido en impurezas y aditivos**

Es generalmente necesario proceder a una corrección del contenido de las sustancias de M < 1 000 para tener en cuenta la contribución de los componentes específicos no poliméricos presentes (por ejemplo, impurezas o aditivos), salvo si el contenido medido es ya < 1 %. Esto se hace mediante el análisis directo de la solución polimérica o del eluido de la CPG.

Cuando el eluido, después de su paso a través de la columna, está demasiado diluido para el análisis posterior, hay que concentrarlo. Puede ser necesario evaporarlo hasta estado seco para disolverlo de nuevo a continuación. La concentración del eluido debe hacerse en condiciones que garanticen que no sufre ningún cambio. El tratamiento del eluido después de la CPG depende del método analítico utilizado para las determinaciones cuantitativas.

1.6.4. **Equipo**

La CPG exige el siguiente equipo:

— depósito de disolvente,

— desgasificador (en su caso),

— bomba,

— amortiguador de pulsaciones (en su caso),

— sistema de inyección,

— columnas de cromatografía,

— detector,

— caudalímetro (en su caso),

— conjunto de registro-tratamiento de los datos,

— receptáculo de residuos.

Es necesario garantizar que el sistema de CPG es inerte respecto a los disolventes utilizados (por ejemplo, utilizando capilares de acero para el disolvente THF).

1.6.5. **Sistema de inyección y de distribución del disolvente**

Un volumen definido de la solución de muestra se pasa a la columna con ayuda de un muestreador automático o bien manualmente, en una zona estrictamente definida. La liberación o la depresión demasiado rápida del émbolo de la jeringuilla pueden causar modificaciones en la distribución de pesos moleculares observada. El sistema de distribución del disolvente deberá, en la medida de lo posible, estar libre de pulsaciones, y lo ideal es que incluya un amortiguador de pulsaciones. El caudal es del orden de 1 ml/mm.

1.6.6. **Columna**

Según la muestra, el polímero se caracterizará con ayuda de una columna simple o de varias columnas conectadas en secuencia. Está disponible en el comercio diverso material para columnas porosas, de propiedades definidas (por ejemplo, tamaño de poro, límites de exclusión). La elección del gel de separación o de la longitud de la columna depende tanto de las propiedades de la muestra (volúmenes hidrodinámicos, distribución de los pesos moleculares) como de las condiciones específicas de la separación, como disolvente, la temperatura y el caudal (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Platos teóricos**

La columna (o la combinación de columnas) utilizada para la separación debe caracterizarse por el número de platos teóricos. En el caso de tomar el THF como disolvente de elución, es necesario cargar una solución de etilbenceno u otro soluto homopolar adecuado en una columna de longitud conocida. El número de platos teóricos viene dado por la siguiente ecuación:

$$N = 5{,}54\left(\frac{V_e}{W_{1/2}}\right)^2 \qquad \text{o} \qquad N = 16\left(\frac{V_e}{W}\right)^2$$

donde

$N$ = número de platos teóricos

$V_c$ = volumen de elución en el máximo del pico

$W$ = anchura del pico en la línea de base

$W_{1/2}$ = anchura del pico a la mitad de la altura.

1.6.8. **Capacidad de separación**

Además del número de platos teóricos, cantidad que determina la anchura de la banda, la capacidad de separación desempeña también un papel y está determinada por la pendiente de la curva de calibración. La capacidad de separación de una columna viene dada por la siguiente relación:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{superficie de la secció tranversal de la columna}} \geq 6{,}0\left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

donde

$V_{e,\ M_x}$ = volumen de elución de un poliestireno de peso molecular $M_x$

$V_{e,(10.M_x)}$ = volumen de elución de un poliestireno de peso molecular diez veces superior.

La resolución del sistema se define generalmente del siguiente modo:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

donde

$V_{e1}$ $V_{e2}$ = volúmenes de elución de los dos patrones de poliestireno en el máximo del pico

$W_1$ $W_2$ = anchuras de los picos en la línea de base

$M_1$, $M_2$, = pesos moleculares en el máximo del pico (deberán diferir en un factor de 10)

El valor R del sistema de columna debería sobrepasar 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Disolvente**

Todos los disolventes deben ser de gran pureza (para el THF, se exigirá una pureza del 99,5 %). El depósito de disolvente (en caso necesario, en una atmósfera de gas inerte) debe ser suficientemente grande para la calibración de la columna y varios análisis de muestras. El disolvente debe desgasificarse antes de su transporte a la columna por la bomba.

1.6.10. **Ajuste de la temperatura**

La temperatura de los componentes internos esenciales (circuito de inyección, columnas, detector y conducciones) será constante y en coherencia con la elección del disolvente.

1.6.11. **Detector**

De detector tiene por objeto registrar cuantitativamente la concentración de muestra eluida de la columna. Para evitar el ensanchamiento inútil de los picos, el volumen de la célula deí detector debe ser lo más bajo posible. No debería exceder de 10 µl excepto en caso de detectores de dispersión de luz y de viscosidad. La detección se hace generalmente por refractometría diferencial. Sin embargo, si alguna propiedad de la muestra o del disolvente de elución lo impone, se puede recurrir a otros tipos de detectores, como por ejemplo, detectores de UV/visible, IR, viscosidad, etc.

2. **RESULTADOS E INFORMES**

2.1. DATOS

Hay que remitirse a la norma DIN (1) respecto al detalle de los criterios de evaluación así como para los imperativos relativos a la recogida y tratamiento de los datos.

De cada muestra deben realizarse dos experiencias independientes, que se analizaran separadamente. En todos los casos, es absolutamente necesario determinar también los datos procedentes de controles tratados en las mismas condiciones que la muestra.

Es necesario indicar explícitamente que los valores medidos son valores relativos equivalentes a los pesos moleculares del patrón utilizado.

Después de la determinación de los volúmenes de retención o del tiempo de retención (eventualmente corregidos con ayuda de un patrón interno), los valores log $M_p$ ($M_p$ es el máximo del pico del patrón de calibración) se representan gráficamente en función de una de estas cantidades. Son necesarios al menos dos puntos de calibración por década de pesos moleculares y cinco puntos de medida al menos para la curva entera, que debe cubrir el peso molecular estimado de la muestra. El peso molecular más bajo de la curva de calibración se define con n-hexilbenceno u otro soluto homopolar adecuado. La porción de la curva que corresponde a los pesos moleculares inferiores a 1 000 se determina y se corrige según sea necesario en función de las impurezas y aditivos. Las curvas de elución se evalúan generalmente por tratamiento informático de los datos. Si se procede a una digitalización manual, se puede consultar el documento ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Si se retiene cualquier polímero insoluble en la columna, su peso molecular será probablemente superior al de la fracción soluble y. si no se tiene en cuenta, conducirá a sohrestimar el contenido en pesos moleculares bajos. El anexo propone principios de corrección del contenido en pesos moleculares bajos en función de los polímeros insolubles.

La curva de distribución debe darse en forma de cuadro o de gráfico (frecuencia diferencial o porcentajes de las sumas frente al log M). Para la representación gráfica, una década de pesos moleculares debería normalmente ocupar unos 4 cm de anchura y el máximo del pico debería encontrarse a unos 8 cm de altura. En el caso de curvas de distribución integral, la diferencia de ordenadas entre 0 y 100 % debería ser de cerca de 10 cm.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

2.2.1. **Sustancia de ensayo**

— información disponible sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas),

— descripción del tratamiento de la muestra, observaciones, problemas.

2.2.2. **Equipo**

— Depósito de eluyente, gas inerte, desgasificación del eluyente, composición del eluyente, impurezas.

— Bomba, amortiguador de pulsaciones, sistema de inyección.

— Columnas de separación (fabricante, toda la información sobre las características de las columnas como tamaño del poro, naturaleza del material de separación, etc., número, longitud y orden de las columnas utilizadas).

— Número de platos teóricos de la columna (o combinación), capacidad de separación (resolución del sistema).

— Información sobre la simetría de los picos.

— Temperatura de la columna, naturaleza del ajuste de la temperatura.

— Detector (principio de medida, volumen de la célula).

— Caudalímetro si se utiliza (fabricante, principio de medida).

— Sistema de registro y tratamiento de los datos (material y programas informáticos).

2.2.3. **Calibración del sistema**

— Descripción precisa del método empleado para construir la curva de calibración.

▼B

— Información sobre los criterios de calidad de este método (por ejemplo, coeficiente de correlación, suma de los cuadrados de los errores, etc.).

— Explicaciones sobre todas las extrapolaciones, hipótesis y aproximaciones hechas durante el procedimiento experimental y la evaluación y tratamiento de los datos.

— Todas las medidas utilizadas para construir la curva de calibración deben precisarse en un cuadro que incluya la información siguiente de cada punto de calibración:

  — nombre de la muestra,

  — fabricante de la muestra,

  — valores característicos de los patrones $M_p$, $M_n$, $M_w$, $M_w/M_n$, proporcionados por el fabricante o derivados de medidas posteriores, junto con precisiones sobre el método de determinación,

  — volumen y concentración de inyección,

  — valor de $M_p$ utilizado para la calibración,

  — volumen de elución o tiempo de retención corregido medido en los máximos de los picos,

  — $M_p$ calculado en el máximo del pico,

  — error porcentual del $M_p$ calculado y del valor de calibración.

2.2.4. **Información sobre el contenido en polímeros de bajo peso molecular**

— Descripción del método utilizado para el análisis y manera de llevar las experiencias.

— Información sobre el porcentaje de contenido en especies de bajo peso molecular (p/p) en relación con la muestra total.

— Información sobre las impurezas, aditivos y otras especies no poliméricas en porcentaje en peso en relación con la muestra total.

2.2.5. **Evaluación**

— Evaluación en función del tiempo: métodos utilizados para garantizar la reproducibilidad requerida (método de corrección, patrón interno, etc.).

— Información sobre sí la evaluación se ha realizado basándose en el volumen de elución o en el tiempo de retención.

— Información sobre los límites de la evaluación si no se analiza completamente un pico.

— Descripción de los métodos de suavizado, si se utilizan.

— Procedimientos de preparación y de tratamiento preliminar de la muestra.

— Posible presencia de partículas no disueltas.

▼B

— Volumen de inyección (µl) y concentración de inyección (mg/ml).

— Observaciones sobre los efectos que llevan a divergencias en relación con el perfil ideal de la CPG.

— Descripción detallada de todas las modificaciones de procedimientos de ensayo.

— Precisiones sobre las gamas de errores.

— Toda la información y observaciones pertinentes para la interpretación de los resultados.

3. **REFERENCIAS**

(1) DIN 55672 (19.95) *Gelpermeationschrornatographie (CPG) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel,* Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., y Bly, D.D. eds, (1979). *Modern Size Exclusión Liquid Chromato- graphy,* J. Wiley and sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Cbromatography (Gel Permeation Chromato-grapby-GPC).* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). *Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystirene by High Performance Size-Exclusion Chromatography.* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

*Anexo*

**Orientaciones para la corrección del contenido en bajos pesos moleculares en presencia de polímeros ínsolubles**

Cuando está presente en una muestra un polímero insoluble, ocasiona una pérdida de masa durante el análisis por CPG. El polímero insoluble se retiene irreversiblemente en la columna o filtro de la muestra mientras que la porción soluble de la muestra pasa a través de la columna. Cuando puede estimarse o medirse el aumento del índice de refracción (dn/dc) del polímero, se puede estimar la pérdida de masa de la muestra en la columna. En este caso, se procede a una corrección mediante calibración externa con materiales patrón de concentraciones y dn/dc conocidas, para calibrar la respuesta del refractómetro. En el siguiente ejemplo, se utiliza un patrón de poli (metilmetacrilato) (pMMA).

En la calibración externa para el análisis de polímeros acrílicos, se analiza por CPG un patrón de pMMA de concentración conocida en tetrahidrofurano y los datos resultantes sirven para establecer la constante del refractómetro según la ecuación:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

donde:

K = constante del refractómetro (en microvoltios; segundos/ml)

R = respuesta del patrón de pMMA (en microvoltios; segundos)

C = concentración del patrón de pMMA (en mg/ml)

V = volumen de inyección (en ml)

dn/dc = aumento del índice de refracción del pMMA en tetrahidrofurano (en ml/mg).

El patrón de pMMA presenta los siguientes datos característicos.

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = $9 \times 10^{-5}$ ml/mg.

El valor K resultante 3,05 x 10", se utiliza entonces para calcular la respuesta teórica del detector si el 100 % del polímero inyectado eluye a través del detector.

▼B

## A.20. COMPORTAMIENTO DE DISOLUCIÓN/EXTRACCIÓN

### 1. MÉTODO

El método descrito es copia de la versión revisada del documento TG 120 de la OCDE (1997). Se encontrará más información técnica en la referencia 1.

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Para algunos polímeros como los polímeros emulsionados, puede ser necesario un trabajo preparatorio antes de que pueda aplicarse el método indicado. El método no es aplicable a los polímeros líquidos ni a los que reaccionan con el agua en las condiciones del ensayo.

Cuando el proceso es poco práctico o inaplicable, el comportamiento de disolución/extracción se puede estudiar por medio de otros métodos. Deberán entonces indicarse los detalles y la justificación del método empleado.

### 1.2 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

### 1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El comportamiento de disolución/extracción de los polímeros en medio acuoso se determina con ayuda del método de frasco (véase A.6, «Hidrosolubilidad, método de frasco») con las modificaciones siguientes.

### 1.4. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

### 1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

#### 1.5.1. **Equipo**

Es necesario el equipo siguiente:

— material de trituración, por ejemplo, triturador que produzca partículas de tamaño conocido,

— agitador, con posibilidad de ajuste de la temperatura,

— sistema de filtro de membrana,

— equipo analítico adecuado,

— tamices normalizados,

#### 1.5.2. **Preparación de la muestra**

En primer lugar, una muestra representativa debe reducirse a partículas de tamaño incluido entre 0,125 y 0,25 mm con ayuda de los tamices convenientes. Puede ser necesario enfriar para garantizar la estabilidad de la muestra o para el proceso de trituración. Los materiales de carácter gomoso pueden triturarse a la temperatura del nitrógeno líquido (1).

Si no se puede llegar al tamaño de partículas requerido, se intentará reducir el tamaño de las partículas en la medida de lo posible y se indicará el resultado. Es necesario que en el informe se indique cómo se ha conservado antes del ensayo la muestra triturada.

▼B

1.53. **Procedimiento**

Se pesan tres muestras de 10 g de sustancia de ensayo en cada uno de los tres frascos equipados de tapones de vidrio; se añaden 1 000 ml de agua a cada uno. Si resulta difícil manipular una cantidad de 10 g de polímero, se utilizará la cantidad inmediata superior que pueda manipularse y se ajustará en consecuencia el volumen de agua.

Los frascos se tapan firmemente y se agitan después a 20 °C. El dispositivo utilizado para sacudir o agitar será capaz de funcionar a temperatura constante. Después de 24 h, se centrifuga o filtra el contenido de cada frasco y se determina por un método de análisis conveniente la concentración de polímero en la fase acuosa clara. Si no se dispone de ningún método de análisis adecuado para la fase acuosa, se podrá considerar la solubilidad/extractividad total a partir del peso seco del residuo filtrado o del precipitado centrifugado.

Es generalmente necesario diferenciar cuantitativamente las impurezas y aditivos por una parte, y las especies de bajo peso molecular por otra parte. En caso de determinación gravimétrica, es importante también realizar un ensayo en blanco, sin utilizar la sustancia de ensayo, para poder tener en cuenta los residuos derivados del procedimiento experimental.

El comportamiento de disolución/extracción de los polímeros en el agua a 37 °C a pH2 y pH9 puede determinarse como se ha descrito para el experimento a 20 °C. Los valores de pH pueden obtenerse por adición de amortiguadores convenientes o de ácidos o bases adecuados, como ácido clorhídrico, ácido acético, hidróxido de potasio o de sodio de grado analítico, o $NH_3$.

Según el método de análisis empleado, se procederá a uno o dos ensayos. Cuando se disponga de métodos suficientemente específicos para un análisis directo en la fase acuosa del componente polimérico, bastará con un ensayo tal como se describe arriba. Sin embargo, cuando no se disponga de tales métodos y la determinación del comportamiento de disolución/extracción del polímero se límite a un análisis indirecto que determina solamente el contenido total en carbono orgánico (COT) del extracto acuoso, será necesario efectuar un segundo ensayo. Este se realizará también por triplicado, con muestras de polímeros diez veces más pequeñas y las mismas cantidades de agua que en el primer ensayo.

1.5.4. **Análisis**

1.5.4.1. *Ensayo realizado con un único tamaño de muestra*

Se dispondrá quizá de métodos de análisis directo de los componentes poliméricos en la fase acuosa. Si no, se podrá considerar también un análisis indirecto de los componentes poliméricos disueltos/extraídos determinando el contenido total de las partes solubles y aportando las correcciones necesarias que tendrán en cuenta los componentes no específicamente poliméricos.

Se puede proceder al análisis del conjunto de las especies poliméricas de la fase acuosa:

con ayuda de un método suficientemente sensible como, por ejemplo:

— COT, con digestión por persulfato o bicromato para liberar $CO_2$, seguida de una estimación por IR o análisis químico,

▼B

— espectrometría de absorción atómica (AAS) o su equivalente de emisión de plasma acoplado por inducción (ICP) para polímeros que contienen silicio o metales,

— absorción UV o espectrofluorometría para los polímeros arílicos,

— espectrometría de masas con cromatografía líquida (LC-MS) para las muestras de bajo peso molecular,

o por evaporación al vacío hasta estado seco del extracto acuoso y análisis espectroscopio (IR, UV, etc.} o análisis AAS/ICP del residuo.

Si el análisis de la fase acuosa como tal no es realizable, el extracto acuoso se someterá a extracción con ayuda de un disolvente orgánico inmiscible con el agua, por ejemplo, un hidrocarburo clorado. El disolvente se evapora a continuación y el residuo se analiza como se índica arriba para determinar su contenido en el polímero correspondiente. Todos los componentes de este residuo identificados como impurezas o aditivos deben restarse para determinar el grado de disolución/extracción del propio polímero.

Cuando estén presentes cantidades relativamente importantes de estos materiales, puede ser necesario someter los residuos a un análisis por CLAR o CG, por ejemplo, para diferenciar las impurezas presentes de las especies monoméricas y derivadas de los monómeros, de modo que pueda determinarse el contenido auténtico de estas últimas.

En algunos casos, pueden bastar la simple evaporación del disolvente orgánico hasta el estado seco y el peso del residuo seco.

1.5.4.2. *Ensayo realizado con dos tamaños de muestras diferentes*

El COT se analizará en todos los extractos acuosos.

Se procederá a una determinación por gravimetría de la parte no disuelta/no extraída de la muestra. Si después de centrifugación o filtrado del contenido de cada frasco, sigue habiendo residuos poliméricos pegados a las paredes de este, se enjuagará con el filtrado hasta que el frasco quede libre de todos los residuos visibles. Luego se filtrará o se centrifugará de nuevo el filtrado. Los residuos que permanezcan sobre el filtro o en el tubo de centrifugación se secan a 40 $^{o}$C al vacío y se pesan. La operación de secado se prolonga hasta llegar a un peso constante.

2. **RESULTADOS**

2.1. ENSAYO REALIZADO CON UN ÚNICO TAMAÑO DE MUESTRA

Se darán los resultados individuales de cada uno de los tres frascos y los valores medios, expresados en unidades de masa por volumen de solución (normalmente en mg/1) o de masa por masa de muestra de polímero (normalmente en mg/g). Además, se indicará también la pérdida de peso de la muestra (calculada como el peso de soluto dividido por el peso de la muestra inicial). Se calculará la desviación típica relativa (RSD). Se darán cifras individuales de la sustancia total (polímero + aditivos esenciales, etc.) y del polímero solo (es decir, después de sustracción de la participación de estos aditivos).

▼B

2.2. ENSAYO REALIZADO CON DOS TAMAÑOS DIFERENTES DE MUESTRAS

Se darán los valores de COT individuales de los extractos acuosos de las dos experiencias por triplicado y el valor medio de cada experiencia, en unidades de masa por volumen de solución (normalmente en mg C/l), así como en unidades de masa por peso de la muestra inicial (normalmente en mg C/g).

Sí no hay diferencia entre los resultados con elevada proporción muestra/agua y con baja proporción muestra/agua, se podrá suponer que todos los componentes, susceptibles de extraerse se han extraído realmente. En este caso, el análisis directo no sería necesario en principio.

Se darán los pesos individuales de los residuos y se expresarán en porcentaje de los pesos inicíales de las muestras. Las medias se calcularán para cada experiencia. Las diferencias entre 100 y los porcentajes encontrados representan los porcentajes de materiales solubles y extraíbles en la muestra original.

3. **INFORME**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe contener la siguiente información:

3.1.1 **Sustancia de ensayo**

— Información disponible sobre la sustancia de ensayo (identidad, aditivos, impurezas, contenido en especies de bajo peso molecular).

3.1.2. **Condiciones experimentales**

— Descripción de los procedimientos utilizados y de las condiciones experimentales.

— Descripción de ios métodos de análisis y de detección.

3.1.3 **Resultados**

— Resultados de solubilidad/extractividad en mg/1; valores individuales y medios para los ensayos de extracción en las distintas soluciones, desglose del contenido en polímeros e impurezas, aditivos, etc.

— Resultados de solubilidad/extractividad en mg/g de polímero.

— Valores de COT de los extractos acuosos, peso del soluto y porcentajes calculados, si se miden.

— pH de cada muestra.

— Información sobre los valores en blanco.

— En caso necesario, referencias a la inestabilidad química de la sustancia de ensayo, tanto durante el procedimiento de ensayo como durante los análisis.

— Toda la información importante para la interpretación de los resultados.

4. **REFERENCIAS**

(1) DIN 53733 (1976) *Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.*

▼B

## A.21. PROPIEDADES COMBURENTES (LÍQUIDOS)

### 1. MÉTODO

#### 1.1 INTRODUCCIÓN

El presente método se ha diseñado para medir el potencial de una sustancia líquida de incrementar la velocidad o la intensidad de combustión de una sustancia combustible, o de provocar la inflamabilidad espontánea cuando se mezcla homogéneamente con una sustancia combustible. Se funda en el ensayo de la ONU de líquidos comburentes (1) y ambos son equivalentes. No obstante, dado que el método A.21 se ha diseñado ante todo para cumplir los requisitos establecidos en la Directiva 67/548/CEE, es suficiente efectuar la comparación con una sola sustancia de referencia. Si está previsto emplear los resultados del ensayo para otros fines ([1]), puede ser necesario realizar el ensayo y la comparación con varias sustancias de referencia.

Si el análisis de la fórmula estructural excluye toda duda razonable de que la sustancia pueda reaccionar exotérmicamente con un material combustible, no será preciso realizar el ensayo.

Antes de llevar a cabo el ensayo, conviene disponer de información preliminar sobre las posibles propiedades explosivas de la sustancia.

Este ensayo no puede realizarse con sólidos, gases, sustancias explosivas o altamente inflamables ni peróxidos orgánicos.

Si ya se dispone de los resultados del ensayo de la ONU de líquidos comburentes (1) para la sustancia en cuestión, no será necesario realizar el presente ensayo,

#### 1.2 DEFINICIONES Y UNIDADES

Tiempo medio de aumento de la presión: media de los tiempos medidos para que la presión de la mezcla de ensayo aumente de 690 kPa a 2 070 kPa (presión manométrica).

#### 1.3 SUSTANCIA DE REFERENCIA

La sustancia de referencia ha de ser ácido nítrico acuoso (pureza de grado analítico) al 65 % (p/p) ([2]).

([1]) Por ejemplo, en el marco de las normas de transporte de la ONU.
([2]) Debe valorarse el ácido antes del ensayo para confirmar su concentración.

▼B

Si el experimentador prevé que los resultados del ensayo pueden emplearse para otros fines, cabe realizar el ensayo con otras sustancias de referencia ([1]).

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se mezcla el líquido que va a estudiarse en proporción de 1/1, en masa, con celulosa fibrosa y se introduce en un recipiente a presión. Si se produce una combustión espontánea durante la mezcla o la introducción, no es necesario proseguir el ensayo.

En caso contrario, se lleva a cabo el ensayo completo. Se calienta]a mezcla en el recipiente a presión y se mide el tiempo medio que tarda la presión en aumentar de 690 kPa a 2 070 kPa (presión manométrica). Se compara el resultado con el tiempo medio de aumento de la presión de una mezcla 1/1 de la sustancia o sustancias de referencia y celulosa.

1.5 CRITERIOS DE CALIDAD

En una serie de cinco pruebas con la misma sustancia ningún resultado debe diferir en más del 30 % de la media aritmética. En caso contrario, es preciso descartar los resultados que difieran en más del 30 % de la media aritmética, mejorar la técnica de mezcla e introducción y repetir el ensayo.

1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1 **Preparación**

1.6.1.1 *Sustancia combustible,*

Se emplea como material combustible celulosa fibrosa deshidratada, cuyas fibras tengan Una longitud comprendida entre 50 y 250 μm y un diámetro medio de 25 μm ([2]). La celulosa se deshidrata hasta peso constante en una capa de espesor máximo de 25 mm a 105 °C durante 4 horas y se conserva en un desecador, con desecante, hasta que sé enfríe y vaya a utilizarse. El contenido acuoso de la celulosa deshidratada ha de ser inferior al 0,5 % de la masa deshidratada ([3]). Si es preciso, se prolonga el tiempo de deshidratación ([4]). Debe emplearse el mismo lote de celulosa para todo el ensayo.

([1]) Por ejemplo, en la referencia bibliográfica 1 se emplean ácido perclórico al 50 % (p/p) y clorato de sodio al 40 % (p/p).

([2]) Por ejemplo, celulosa en polvo para columna de cromatografía Whatman CF 11, nº de catálogo 4021 050.

([3]) Confirmado, por ejemplo, mediante valoración de Karl-Fisher.

([4]) También puede obtenerse ese contenido acuoso (por ejemplo) calentando la celulosa a 105 °C al vacío durante 24 h.

▼B

1.6.1.2 *Equipo*

1.6.1.2.1 Recipiente a presión

Se necesita un recipiente a presión, formado por un cilindro de acero de 89 mm de largo y 60 mm de diámetro exterior (véase la figura 1). Se practican dos rebajes planos diametralmente opuestos (que reducen esa sección transversal del recipiente a 50 mm) para inmovilizarlo mientras se ajustan la pieza de encendido y la de sujeción del diafragma de seguridad. El recipiente ha de tener una luz de 20 mm, que se ensanchará a ambos extremos del cilindro rebajando las paredes internas en una longitud de 19 mm y se fileteará de manera que pueda alojar una rosca del tipo *British Standard Pipe* (BSP) de 1" o su equivalente métrico. En la superficie convexa del recipiente, a 35 mm de un extremo y a 90° de los rebajes planos, se enrosca un tubo lateral que servirá para medir la presión. El extremo del tubo estará provisto de una rosca de 1/2" BSP (o su equivalente métrico), que se ajustará en una cavidad de 12 mm de profundidad practicada en la pared del recipiente y fileteada debidamente. Si es necesario, se sella con un material inerte para evitar la fuga de gas. El tubo lateral sobresale 55 mm del recipiente a presión y tiene una luz de 6 mm. La cara interna del extremo libre del tubo se rebaja y filetea para que pueda alojar un transductor de presión de tipo diafragmático. Puede emplearse cualquier medidor de presión que no sufra alteraciones debido a los gases calientes ni a los productos de descomposición y que pueda detectar aumentos de presión de 690 a 2 070 kPa en menos de 5 ms.

Se cierra el extremo del recipiente más alejado del tubo lateral con una pieza de encendido provista de dos electrodos, uno de ellos aislado del cuerpo de la pieza y el otro unido a masa con este. El otro extremo del recipiente se obtura con un diafragma de seguridad (presión aproximada de rotura: 2 200 kPa), que se mantiene en su lugar mediante una pieza de sujeción que presenta una luz de 20 mm. Si es necesario, se sella la pieza de encendido con material inerte para evitar la fuga de gas. Para mantener el conjunto en la posición correcta durante la utilización, se emplea un soporte de acero suave (figura 2), que suele estar formado por una base de 235 mm × 184 mm × 6 mm y un tubo hueco de sección cuadrada (70 mm × 70 mm × 4 mm) de 185 mm de longitud.

En uno de los extremos del tubo cuadrado se seccionan dos caras opuestas, de manera que se obtenga un tubo de 86 mm de largo prolongado por dos lados planos a modo de patas, que se cortan para que, una vez soldado a la base, el tubo forme un ángulo de 60° con la horizontal. En el extremo superior de una de las caras del tubo se practica una muesca de 22 mm de ancho y 46 mm de profundidad, de manera que, al colocar el recipiente a presión en el soporte con la pieza de encendido hacia abajo, el tubo lateral para medir la presión quede alojado en ella. En la cara interna de la pared del tubo orientada hacia abajo se suelda una pieza de acero de 30 mm de ancho y 6 mm de grueso para que sirva de separador. En la pared opuesta se hacen dos orificios y se enroscan dos tornillos de palomilla de 7 mm para fijar el recipiente a presión. Para sujetar el recipiente desde abajo, se sueldan dos rebordes de acero de 12 mm de ancho y 6 mm de grueso a los laterales de la parte inferior de la sección cuadrada.

▼B

1.6.1.2.2 Dispositivo de ignición

El dispositivo de ignición está integrado por un hilo de Ni/Cr de 25 cm de largo y 0,6 mm de sección, con una resistencia de 3,85 ohm/m. El hilo se enrolla en forma de bobina con una varilla de 5 mm de diámetro y se une a los electrodos de la pieza de encendido. La bobina ha de ajustarse a uno de los esquemas de la figura 3. La distancia entre la cara superior de la pieza de encendido y. la cara inferior de la bobina de ignición debe ser de 20 mm. Si los electrodos no son regulables, los segmentos de hilo que se encuentran entre la bobina y la cara superior de la pieza de encendido deben aislarse con un revestimiento cerámico. El hilo se calienta mediante una alimentación eléctrica-estable que proporcione una intensidad de 10 A como mínimo.

1.6.2 **Realización del ensayo** ([1])

Se coloca en el soporte el recipiente montado con el transductor de presión y el dispositivo de ignición, pero sin el diafragma de seguridad, con la pieza de encendido hacia abajo. Se introducen 2,5 g del líquido que vaya a someterse a ensayo y 2,5 g de celulosa deshidratada en una copa de vidrio y se mezclan con un agitador de cristal ([2]). Por motivos de seguridad, la persona que realice la mezcla debe interponer una pantalla protectora. Si se produce una combustión espontánea' durante la mezcla o la introducción, no es necesario proseguir el ensayo. Se introduce la mezcla en pequeñas cantidades en el recipiente a presión dando ligeros golpecitos y se comprueba que la mezcla rodea bien y está en contacto con la bobina de ignición sin dejar hueco. La bobina no debe deformarse durante este proceso, pues ello podría falsear los resultados ([3]). Se coloca en su lugar el diafragma de seguridad y se enrosca al máximo la pieza de sujeción. Se coloca el recipiente cargado en el soporte con el disco de seguridad hacia arriba y se introduce el conjunto en una campana extractora blindada o una cámara de fuego. Se conectan los bornes externos de la pieza de encendido a una alimentación eléctrica y se aplica una corriente de 10 A. No deben transcurrir más de 10 minutos entre el inicio de la preparación de la mezcla y el momento en que se aplica la corriente.

La señal emitida por el transductor de presión se recoge en un sistema que permita el registro continuo de la curva presión/tiempo y su análisis (por ejemplo, un registrador de señales transitorias acoplado a un registrador sobre cinta de papel). Se calienta la mezcla hasta que se rompa el diafragma de seguridad o durante un tiempo mínimo de 60 s. Si no se ha roto el diafragma, debe esperarse a que la mezcla se enfríe antes de abrir el recipiente con prudencia y tomando las debidas precauciones por si estuviera aún a presión. Se realizan cinco ensayos con la mezcla y con la sustancia o sustancias de referencia. Se registra el tiempo que tarda la presión en aumentar de 690 kPa a 2 070 kPa (presión manométrica). Se calcula la media de los tiempos registrados.

En algunos casos, las sustancias pueden generar un aumento de presión (demasiado elevado o demasiado escaso) debido a reacciones químicas que no son características de las propiedades comburentes de dichas sustancias. Puede entonces ser necesario repetir el ensayo sustituyendo la celulosa por un material inerte, como la diatomita (kieselguhr), para cerciorarse de que no se trata de un efecto no comburente.

([1]) Las mezclas de sustancias comburentes y celulosa deben tratarse como potencialmente explosivas y manipularse con las debidas precauciones.

([2]) En la práctica, puede prepararse una mezcla 1/1 de líquido problema y celulosa en cantidad superior a la necesaria para el ensayo, tomar 5 ± 0,1 g e introducirlos en el recipiente a presión. La mezcla debe prepararse justo antes de cada ensayo.

([3]) Debe evitarse sobre todo que entren en contacto las circunvoluciones adyacentes de la bobina.

▼B

2. **RESULTADOS**

Tiempos de aumento de la presión con la sustancia de ensayo y con la sustancia o sustancias de referencia. Tiempos de aumento de la presión con una sustancia inerte, si procede.

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se calcula el tiempo medio de aumento de la presión con la sustancia de ensayo y con la sustancia o sustancias de referencia.

Se calcula el tiempo medio de aumento de la presión con una sustancia inerte, si procede.

El cuadro 1 recoge algunos ejemplos de resultados.

*Cuadro 1*

**Ejemplos de resultados** [a]

| Sustancia [b] | Tiempo medio de aumento de la presión con una mezcla de 1/1 de celulosa (ms) |
|---|---|
| Ácido nítrico, 65 % | 4 767 [c] |
| Ácido perclórico, 50 % | 121 [c] |
| Ácido perclórico, 55 % | 59 |
| Bicromato de amonio, en solución acuosa saturada | 20 800 |
| Clorato de sodio, en solución acuosa al 40 % | 2 555 [c] |
| Nitrato de calcio, en solución acuosa saturada | 6 700 |
| Nitrato férrico, en solución acuosa saturada | 4 133 |
| Nitrato de níquel, en solución acuosa saturada | 6 250 |
| Nitrato de plata, en solución acuosa saturada | [d] |
| Nitrato de potasio, en solución acuosa al 30 % | 26 690 |
| Nitrato de sodio, en solución acuosa al 45 % | 4 133 |
| Perclorato de litio, en solución acuosa saturada | 1 686 |
| Perclorato de magnesio, en solución acuosa saturada | 777 |
| *Sustancia inerte* | |
| Agua/celulosa | [d] |

[a] Véase la referencia bibliográfica (1) para la clasificación según el régimen de transporte de la ONU.
[b] Las soluciones saturadas deben prepararse a 20 °C.
[c] Valor medio de ensayos interlaboratorios comparados.
[d] No se alcanza la presión máxima de 2 070 kPa.

▼B

3. **INFORME**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

En el informe del ensayo debe figurar la información siguiente:

— identidad, composición, pureza, etc. de la sustancia de ensayo,

— concentración de la sustancia de ensayo,

— procedimiento empleado para deshidratar la celulosa,

— contenido acuoso de la celulosa empleada,

— resultados de las mediciones,

— resultados de los ensayos con la sustancia inerte, si procede,

— tiempos medios calculados de aumento de la presión,

— cualquier desviación respecto al presente método y justificación correspondiente,

— cualquier información u observación complementaria importante para interpretar los resultados;

3.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS ([1])

La evaluación de los resultados del ensayo se fundará en los siguientes criterios:

a) la mezcla de sustancia de ensayo y celulosa se inflama espontáneamente o no;

b) la comparación del tiempo medio de aumento de la presión de 690 kPa a 2 070 kPa con el tiempo medio correspondiente a la sustancia o sustancias de referencia.

Se considerará que una sustancia líquida es comburente si:

a) una mezcla de 1/1 en masa de dicha sustancia y celulosa se inflama espontáneamente, o

b) el tiempo medio de aumento de la presión de una mezcla de 1/1 en masa de dicha sustancia y celulosa es inferior ó igual al tiempo medio de una mezcla de 1/1 en masa de ácido nítrico acuoso al 65 % (p/p) y celulosa.

Con el fin de evitar falsos positivos, a la hora de interpretar los resultados deben tomarse en consideración los resultados del ensayo con la sustancia y un material inerte.

([1]) Véase la referencia bibliográfica 1 para la interpretación de los resultados conforme a las normas de transporte de la ONU en caso de que se utilicen varias sustancias de referencia.

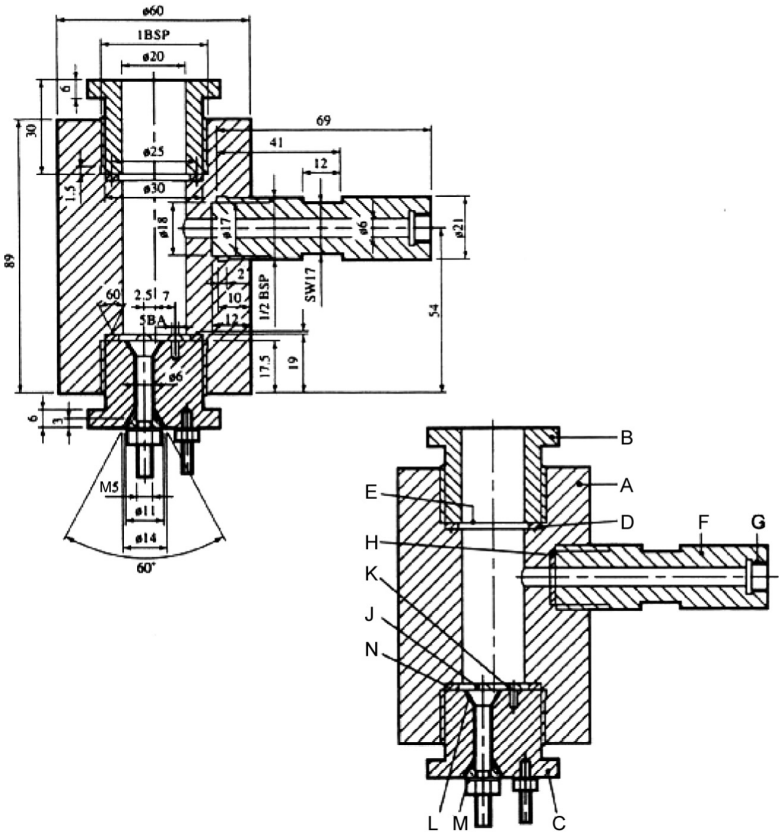
▼B

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 2- edición revisada. Publicación de la ONU nº ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, p. 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

*Figura 1*

**Recipiente a presión**




A = Cuerpo del recipiente a presión

B = Sujeción del diafragma de seguridad

C = Pieza de encendido

D = Junta de plomo blando

E = Diafragma de seguridad

F = Tubo-toma de presión

G = Rosca para transductor de presión

H = Junta

J = Electrodo aislado

K = Electrodo unido a masa

L = Aislamiento

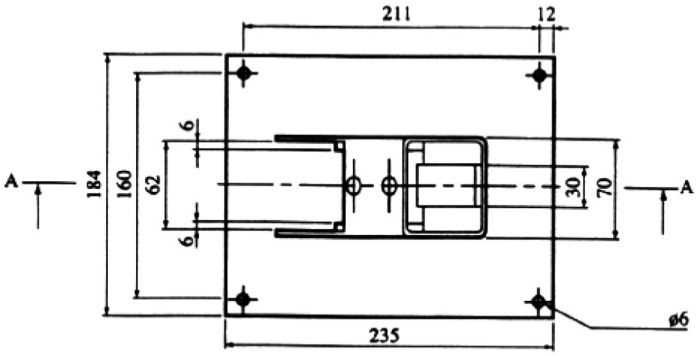
M = Cono de acero

N = Ranura de deformación de la junta

▼B

*Figura 2*

**Soporte**



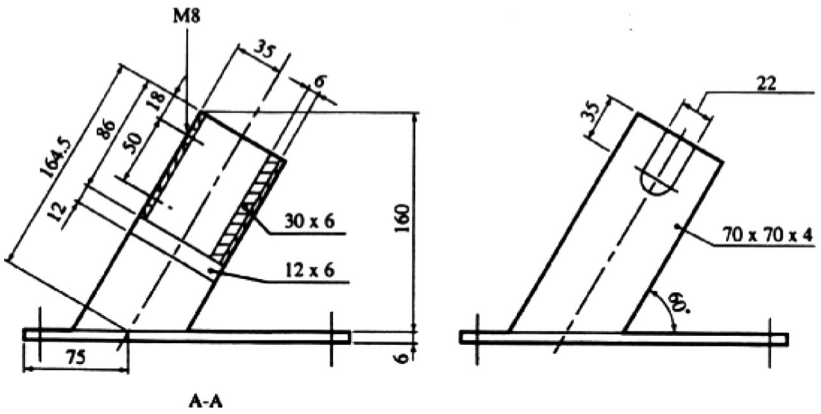
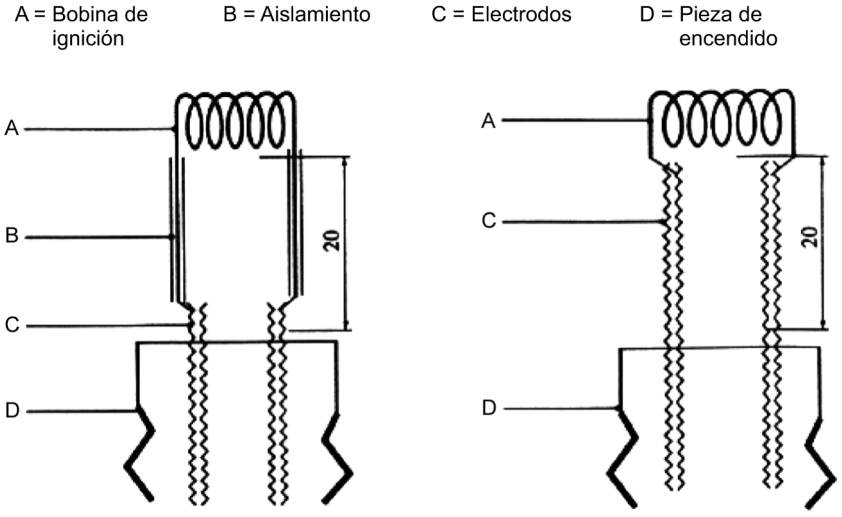




*Figura 3*

**Dispositivo de ignición**




Nota: cualquiera de estas dos configuraciones puede ser utilizada.

▼M1

## A.22. DIÁMETRO MEDIO GEOMÉTRICO DE LAS FIBRAS PONDERADO POR LA LONGITUD

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método describe un procedimiento para medir el diámetro medio geométrico ponderado por la longitud (DMGPL) de las fibras minerales artificiales a granel. Como el DMGPL de la población tendrá una probabilidad del 95 % de encontrarse entre los límites del intervalo de confianza del 95 % [DMGPL ± dos errores estándar (EE)] de la muestra, el valor registrado (resultado de la prueba) será el límite inferior de confianza del 95 % de la muestra (DMGPL-2EE). El método se basa en la actualización, de junio de 1994, de un proyecto de procedimiento industrial del HSE, adoptado en la reunión entre este organismo y la ECFIA que se celebró en Chester el 26 de septiembre de 1993, y modificado en relación con un segundo ensayo interlaboratorios (1, 2). Este método de medición puede utilizarse para caracterizar el diámetro de las fibras de sustancias o productos a granel que contengan fibras minerales artificiales, incluidas las fibras cerámicas refractarias, las fibras vítreas artificiales y las fibras cristalinas y policristalinas.

La ponderación por la longitud es una forma de compensar el efecto que tiene sobre la distribución de los diámetros la ruptura de las fibras largas en el momento de manipular el material o de tomar muestras de él. Para medir la distribución por tamaños de los diámetros de las fibras minerales artificiales se utiliza la media geométrica porque esta distribución suele aproximarse a la normal logarítmica.

Sería pesado y llevaría mucho tiempo medir la longitud además del diámetro, pero si se miden solo las fibras que tocan una línea infinitamente fina en un campo de visión del microscopio electrónico de barrido, la probabilidad de seleccionar una fibra determinada es proporcional a su longitud. Como así se tiene en cuenta la longitud a efectos de la ponderación, la única medición necesaria es la del diámetro, y el resultado (DMGPL-2EE) puede calcularse de la forma descrita.

#### 1.2. DEFINICIONES

**Partícula**: objeto cuya relación longitud/grosor es inferior a 3:1.

**Fibra**: objeto cuya relación longitud/grosor (relación de aspecto) es al menos de 3:1.

#### 1.3. ÁMBITO Y LIMITACIONES

El método está concebido para estudiar distribuciones de diámetros con medianas entre 0,5 μm y 6 μm. Es posible medir diámetros más grandes mediante el uso de un número menor de aumentos del microscopio electrónico de barrido, pero el método estará más limitado para distribuciones de fibras más finas, por lo que se recomienda una medición con microscopio electrónico de transmisión si el diámetro medio está por debajo de 0,5 μm.

▼M1

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se toma una serie de muestras cilíndricas representativas de la placa de fibras o de las fibras sueltas a granel. Se reduce la longitud de las fibras a granel mediante aplastamiento, y se dispersa en agua una submuestra representativa. Se extraen alícuotas que se pasan por un filtro de policarbonato de 0,2 μm de diámetro de poro, y se preparan para su examen mediante microscopia electrónica de barrido. Se miden los diámetros de las fibras con un número de aumentos en pantalla de 10 000 o mayor ([1]), utilizando el método de intersección con una línea, a fin de obtener una estimación no sesgada del diámetro mediano. Se calcula el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % (a partir de un ensayo unilateral) para obtener una estimación del valor mínimo del diámetro medio geométrico de las fibras del material.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.5.1. **Seguridad/precauciones**

Debe reducirse al mínimo la exposición del personal a las fibras presentes en el aire, y la manipulación de las fibras secas debe efectuarse en una campana de gases o en un aislador (cabina de seguridad con guantes). Debe procederse a un seguimiento periódico de la exposición del personal para determinar la eficacia de los métodos de reducción. Para manipular fibras minerales artificiales hay que llevar guantes desechables, a fin de reducir la irritación de la piel y evitar la contaminación cruzada.

1.5.2. **Equipo**

— Prensa y troqueles (capaces de alcanzar 10 MPa).

— Filtros capilares de policarbonato de 0,2 μm de diámetro de poro (25 mm de diámetro).

— Filtro de membrana de ésteres de celulosa de 5 μm de diámetro de poro, utilizado como soporte del filtro.

— Equipo de filtración de vidrio (o sistema de filtración desechable) válido para filtros de 25 mm de diámetro (por ejemplo, equipo de microanálisis de vidrio de Millipore, tipo XX10 025 00).

— Agua recién destilada, pasada por un filtro de 0,2 μm de diámetro de poro para eliminar los microorganismos.

— Revestidor de pulverización con objetivo de oro o de oro/paladio.

— Microscopio electrónico de barrido capaz de llegar a una resolución de 10 nm y de proporcionar 10 000 aumentos.

— Otro material: espátulas, hojas de bisturí de tipo 24, pinzas, tubos de microscopio electrónico de barrido, pegamento de carbono o cinta adhesiva de carbono, plata coloidal.

— Sonda de ultrasonidos o baño de ultrasonidos de sobremesa.

— Muestreador de cilindro o sacabocados, para tomar muestras cilíndricas de una placa de fibras minerales artificiales.

([1]) Este número de aumentos está indicado para fibras de 3 μm; en caso de fibras de 6 μm puede ser más adecuado utilizar 5 000 aumentos.

▼**M1**

1.5.3. **Procedimiento**

1.5.3.1. *Muestreo*

En caso de mantas o placas, se utiliza un muestreador de cilindro de 25 mm o un sacabocados para tomar muestras de la sección transversal. Las muestras deben tomarse de puntos situados a intervalos iguales a lo ancho de una pequeña longitud de la placa, o bien de zonas aleatorias si se dispone de grandes longitudes de placa. El mismo equipo puede utilizarse para extraer muestras aleatorias de fibras sueltas. A ser posible, deben tomarse seis muestras para tener en cuenta las variaciones espaciales del material a granel.

Las seis muestras cilíndricas deben aplastarse en un troquel de 50 mm de diámetro a la presión de 10 MPa. Se mezcla el material con la espátula y se vuelve a someter a 10 MPa. Después se saca el material del troquel y se conserva en un frasco de cristal herméticamente cerrado.

1.5.3.2. *Preparación de la muestra*

En caso necesario puede eliminarse el eventual ligante orgánico poniendo las fibras en un horno a 450 °C durante una hora aproximadamente.

Formar un cono y separar en partes para subdividir la muestra (esta operación debe realizarse dentro de una campana de gases).

Con ayuda de una espátula, añadir una pequeña cantidad (< 0,5 g) de muestra a 100 ml de agua recién destilada que se ha pasado a través de un filtro de membrana de 0,2 μm (pueden utilizarse otras fuentes de agua ultrapura si se demuestra que son satisfactorias). Dispersar totalmente utilizando una sonda de ultrasonidos con una potencia de 100 W y ajustada de forma que se produzca cavitación. (Si no se dispone de sonda, utilizar el método siguiente: agitar repetidamente e invertir durante 30 segundos; poner durante cinco minutos en baño de ultrasonidos de sobremesa; volver a agitar repetidamente e invertir durante otros 30 segundos.)

Inmediatamente después de la dispersión de las fibras, tomar una serie de alícuotas (por ejemplo, tres alícuotas de 3, 6 y 10 ml) con una pipeta de boca ancha (de 2 a 5 ml de capacidad).

Filtrar en vacío cada alícuota a través de un filtro de policarbonato de 0,2 μm, puesto sobre un filtro de soporte de MEC de 5 μm, utilizando un embudo de filtración de vidrio de 25 mm, con depósito cilíndrico. Deben ponerse en el embudo unos 5 ml de agua destilada filtrada; la alícuota se pipetea lentamente al interior del agua, manteniendo la punta de la pipeta por debajo del menisco. La pipeta y el depósito deben enjuagarse a fondo después, ya que las fibras más finas tienden a situarse más en la superficie.

Tomar cuidadosamente el filtro y separarlo del filtro de soporte antes de ponerlo en un recipiente para que se seque.

▼M1

Cortar una sección de un cuarto o un medio de lo retenido en el filtro con una hoja de bisturí de tipo 24, mediante un movimiento de vaivén. Poner cuidadosamente la sección cortada en un portaobjetos de microscopio electrónico de barrido utilizando una lengüeta adhesiva de carbono o pegamento de carbono. Debe ponerse plata coloidal al menos en tres posiciones para mejorar el contacto eléctrico en los bordes del filtro y del portaobjetos. Una vez secos el pegamento y la plata coloidal, revestir la superficie de la muestra con aproximadamente 50 nm de oro u oro/paladio mediante pulverización.

1.5.3.3. *Calibración y funcionamiento del microscopio electrónico de barrido*

1.5.3.3.1. Calibración

La calibración del microscopio electrónico de barrido debe comprobarse al menos una vez por semana (lo ideal es una vez al día) mediante una rejilla de calibración certificada. La calibración debe comprobarse frente a un patrón certificado y, si el valor medido no está en el intervalo de ± 2 % del valor certificado, es necesario ajustar la calibración y volver a comprobarla.

El microscopio debe ser capaz de resolver al menos un diámetro visible mínimo de 0,2 μm, utilizando una matriz de muestra real, a 2 000 aumentos.

1.5.3.3.2. Funcionamiento

El microscopio debe funcionar a 10 000 aumentos ([1]), en condiciones que den una buena resolución con una imagen aceptable a velocidad baja de exploración, como, por ejemplo, 5 segundos por pantalla. Aunque pueden variar los requisitos de funcionamiento de los distintos microscopios electrónicos de barrido, para obtener la mejor visibilidad y resolución con materiales de peso atómico relativamente bajo debe utilizarse en general una tensión de aceleración de 5 a 10 keV, habiéndose fijado un pequeño tamaño del punto y una corta distancia de trabajo. Como se efectúa un recorrido lineal, debe utilizarse una inclinación de $0^{o}$ para minimizar el reenfoque o bien, si el microscopio tiene una platina eucéntrica, debe utilizarse la distancia de trabajo eucéntrica. Puede utilizarse un número menor de aumentos si el material solo contiene fibras de diámetro grande (> 5 μm).

1.5.3.4. *Medición*

1.5.3.4.1. Examen con pocos aumentos para evaluar la muestra

La muestra debe examinarse inicialmente con pocos aumentos para ver si hay indicios de aglutinación de fibras grandes y para evaluar la densidad de las fibras. En caso de aglutinamiento excesivo, se recomienda preparar una muestra nueva.

Para conseguir una buena exactitud estadística, es necesario medir un número mínimo de fibras, y parece conveniente tener una elevada densidad de fibras, ya que examinar campos vacíos supone un gasto de tiempo que no aporta nada al análisis. Sin embargo, si el filtro está superpoblado, se hace difícil medir todas las fibras medibles y es posible pasar por alto las fibras pequeñas que puedan estar ocultas por otras mayores.

([1]) En caso de fibras de 3 μm, véase la nota anterior.

▼**M1**

Puede aparecer un sesgo de sobreestimación del DMGPL si la densidad supera las 150 fibras por milímetro de recorrido lineal. Por otra parte, una baja concentración de fibras supone un aumento del tiempo de análisis, y suele ser más rentable preparar una muestra con una densidad de fibras próxima a la óptima, en vez de seguir haciendo recuentos con filtros de baja concentración. La densidad óptima de fibras debe proporcionar una media de una o dos fibras contables por campo de visión a 5 000 aumentos. Sin embargo, la densidad óptima depende del tamaño (diámetro) de las fibras, por lo que el operario debe utilizar su experiencia para decidir si la densidad de las fibras está próxima a la óptima o no.

1.5.3.4.2. Ponderación de los diámetros de las fibras por la longitud

Solo se cuentan las fibras que tocan (o cruzan) una línea (infinitamente) fina trazada en la pantalla del microscopio. Con este fin se traza una línea horizontal (o vertical) por el centro de la pantalla.

Otra posibilidad es situar un solo punto en el centro de la pantalla e iniciar una exploración en una sola dirección a través del filtro. Se mide y se registra el diámetro de cada fibra cuya relación longitud/grosor (relación de aspecto) sea superior a 3:1 y que toque o cruce este punto.

1.5.3.4.3. Medición de las fibras

Se recomienda medir como mínimo 300 fibras. Cada fibra se mide solo una vez en el punto de intersección con la línea o el punto trazado en la imagen (o cerca del punto de intersección si los bordes de las fibras están poco claros). Si se encuentran fibras de secciones transversales no uniformes, debe tomarse una medida que represente su diámetro medio. Ha de tenerse cuidado al definir el borde y medir la distancia más corta entre los bordes de la fibra. La medición puede hacerse directamente o bien después, con fotografías o imágenes grabadas. Son recomendables los sistemas semiautomáticos de medición de imágenes que descargan datos directamente a una hoja de cálculo, ya que así se ahorra tiempo, se eliminan errores de transcripción y pueden automatizarse los cálculos.

Debe comprobarse con pocos aumentos que los extremos de las fibras largas no se recurvan en el campo de visión de la medición y que solo se miden una vez.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Los diámetros de las fibras no suelen tener una distribución normal. Sin embargo, mediante una transformación logarítmica es posible obtener una distribución que se aproxime a la normal.

Se calculan la media aritmética (lnD medio) y la desviación típica ($DT_{lnD}$) de los logaritmos neperianos (lnD) de los diámetros (D) de las n fibras.

$$\text{medio } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$DT_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{medio } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

La desviación típica se divide por la raíz cuadrada del número de mediciones (n) para obtener el error estándar ($EE_{lnD}$).

$$EE_{lnD} = \frac{DT}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Se resta de la media dos veces el error estándar y se calcula el exponencial del valor obtenido (media menos dos veces el error estándar) para dar la media geométrica menos dos errores estándar geométricos.

$$DMGPL - 2EE = e^{(\text{medio } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la siguiente información:

— el valor de DMGPL-2EE,

— las eventuales desviaciones y, en particular, las que puedan afectar a la precisión o a la exactitud de los resultados, con su justificación pertinente.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

(2) G. Burdett y G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division. 1994.

▼M4

## A.23. COEFICIENTE DE REPARTO (1-OCTANOL/AGUA): MÉTODO DE AGITACIÓN LENTA

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 123 (2006) de la OCDE. El método de agitación lenta (1) ha permitido determinar con exactitud el coeficiente de reparto 1-octanol/agua ($P_{OW}$) con valores de hasta un log $P_{OW}$ de 8,2. Por lo tanto, es un enfoque experimental idóneo para la determinación directa del $P_{OW}$ de sustancias altamente hidrófobas.

2. Otros métodos para determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua ($P_{OW}$) son el método "de frasco de agitación" (2) y la determinación del $P_{OW}$ basada en el comportamiento de retención en CLAR de fase inversa (3). El método "de frasco de agitación" es proclive a dar artefactos por la transferencia de microgotas de octanol a la fase acuosa. Al aumentar los valores de $P_{OW}$, la presencia de estas microgotas en la fase acuosa provoca una sobrevaloración creciente de la concentración de la sustancia problema en el agua. Por este motivo es aplicable solo a las sustancias con log $P_{OW}<4$. El segundo método se basa en los datos sólidos de valores de $P_{OW}$ medidos directamente para calibrar la relación entre el comportamiento de retención en CLAR y los valores medidos de $P_{OW}$. Hubo un proyecto de directrices de la OCDE para determinar los coeficientes de reparto 1-octanol/agua de las sustancias ionizables (4), pero ya no está vigente.

3. Este método de ensayo ha sido desarrollado en los Países Bajos. La precisión de los métodos aquí descritos ha sido validada y optimizada en un estudio de validación interlaboratorios, en el que participaron quince laboratorios (5).

### CONSIDERACIONES INICIALES

**Fundamento y aplicación**

4. Se ha observado una relación altamente significativa entre los coeficientes de reparto 1-octanol/agua ($P_{OW}$) de las sustancias orgánicas inertes y su bioacumulación en los peces. Por lo demás, se ha demostrado que el $P_{OW}$ posee una buena correlación con la toxicidad en peces y también con la sorción de los compuestos químicos a sólidos como suelos y sedimentos. Una amplia visión general de estas relaciones se recoge en la bibliografía (6).

5. Se han establecido muy diversas relaciones entre el coeficiente de reparto 1-octanol/agua y otras propiedades de las sustancias relevantes para la química y toxicología medioambientales. Por esta razón, el coeficiente de reparto 1-octanol/agua se ha convertido en un parámetro clave en la evaluación del riesgo medioambiental de los compuestos químicos y de su destino final en el medio ambiente.

**Ámbito de aplicación**

6. Se considera que el ensayo de agitación lenta reduce la formación de microgotas a partir de las gotitas de 1-octanol en la fase acuosa. Por esta razón no hay riesgo de sobrevalorar la concentración acuosa debido a las moléculas de la sustancia problema asociadas a las gotitas. Así pues, el método de agitación lenta es particularmente aplicable a la determinación del $P_{OW}$ de sustancias con valores esperados de log $P_{OW}$ de 5 y mayores, en las que el método de frasco de agitación (2) tendería a dar resultados erróneos.

▼M4

DEFINICIONES Y UNIDADES

7. El coeficiente de reparto de una sustancia entre el agua y un disolvente lipófilo (1-octanol) define la distribución en equilibrio del compuesto químico entre las dos fases. El coeficiente de reparto entre el agua y el 1-octanol ($P_{OW}$) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio de la sustancia problema en 1-octanol saturado con agua ($C_O$) y en agua saturada con 1-octanol ($C_W$).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Al ser un cociente entre dos concentraciones es adimensional. Se indica generalmente en forma de su logaritmo decimal (log $P_{OW}$). El Pow es dependiente de la temperatura, por lo que los datos del informe incluirán la temperatura de la medición.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

8. Con el fin de determinar el coeficiente de reparto, se equilibran el agua, el 1-octanol y la sustancia problema a temperatura constante. Seguidamente se determinan las concentraciones de la sustancia problema en las dos fases.

9. Las dificultades experimentales asociadas a la formación de microgotas durante el experimento de frasco de agitación se consiguen reducir en el ensayo de agitación lenta que proponemos aquí. En el ensayo de agitación lenta, el agua, el 1-octanol y la sustancia problema se equilibran en un reactor agitado termostatizado. El intercambio entre las fases se acelera mediante agitación. La agitación introduce una turbulencia limitada, lo que facilita el intercambio entre el 1-octanol y el agua sin que se formen microgotas (1).

APLICABILIDAD DEL ENSAYO

10. Dado que la presencia de otras sustancias distintas podría influir en el coeficiente de actividad de la sustancia problema, se analizará esta como sustancia pura. En el ensayo de reparto 1-octanol/agua se empleará la sustancia de máxima pureza comercialmente disponible.

11. El presente método es aplicable a sustancias puras que no se disocian ni asocian y que no presentan una actividad interfacial importante. Permite determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua de estas sustancias y de sus mezclas. Cuando el método se aplica a las mezclas, los coeficientes de reparto 1-octanol/agua determinados son condicionales, al depender de la composición química de la mezcla analizada y de la composición de electrolitos utilizada en la fase acuosa. Siempre que se tomen medidas complementarias, el método es también aplicable a compuestos que se disocian o asocian (punto 12).

12. Debido a los múltiples equilibrios que intervienen en el reparto 1-octanol/agua de las sustancias que se disocian, como los ácidos orgánicos y los fenoles, las bases orgánicas y los compuestos organometálicos, el coeficiente de reparto 1-octanol/agua es una constante condicional que depende intensamente de la composición electrolítica (7) (8). Por consiguiente, para determinar el coeficiente de reparto 1-octanol/agua es necesario controlar y documentar el pH y la composición electrolítica del ensayo. La evaluación de los coeficientes de reparto ha de confiarse al juicio de un experto. A partir del valor de la(s) constante(s) de disociación se elegirán los valores de pH idóneos, a fin de determinar un coeficiente de reparto por cada estado de ionización. Cuando se analizan compuestos organometálicos deben emplearse soluciones amortiguadores que no formen complejos (8). Teniendo en cuenta los datos conocidos sobre la química en medio acuoso (constantes de complejación, constantes de disociación), se elegirán las condiciones experimentales de modo tal que permita estimar la especiación de la sustancia problema en la fase acuosa. La fuerza iónica ha de ser idéntica en todos los ensayos, para lo cual se empleará un electrolito de fondo.

▼M4

13. Pueden surgir dificultades analíticas cuando se aplica el ensayo a sustancias con hidrosolubilidad baja o con $P_{OW}$ elevado, pues en ese caso las concentraciones en el agua serán muy bajas, dificultando una determinación exacta. El presente método de ensayo facilita indicaciones para solventar esta dificultad.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

14. Los reactivos químicos serán de calidad analítica o de más alta pureza. Se recomienda el uso de sustancias problema no marcadas de composición química conocida y pureza preferiblemente del 99 %, al menos, o de sustancias problema radiomarcadas de composición química y pureza radioquímica conocidas. En caso de marcadores de semivida breve, deben aplicarse correcciones para tener en cuenta su desintegración. En caso de sustancias problema radiomarcadas, deberá emplearse un método de análisis químico específico para garantizar que la radiactividad medida está en relación directa con la sustancia problema.

15. Puede obtenerse una estimación de log $P_{OW}$ con ayuda de programas informáticos comerciales para tal fin, o bien aplicando la relación de solubilidades en ambos disolventes.

16. Antes de emprender un ensayo de agitación lenta para la determinación del $P_{OW}$, es preciso conocer la siguiente información acerca de la sustancia problema:

a) fórmula estructural;

b) métodos analíticos apropiados para determinar la concentración de la sustancia en agua y en 1-octanol;

c) constante(s) de disociación de las sustancias ionizables [Directrices 112 de la OCDE (9)];

d) hidrosolubilidad (10);

e) hidrólisis abiótica (11);

f) biodegradabilidad fácil (12);

g) presión de vapor (13).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Material**

17. Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

— agitadores magnéticos y barras de agitación magnéticas recubiertas de teflón para agitar la fase acuosa;

— instrumental analítico adecuado para determinar la concentración de la sustancia problema a las concentraciones esperadas;

— cubeta de agitación provista de grifo de desagüe. Dependiendo de la estimación del log POW y del límite de detección (LOD) de la sustancia problema, se ha planteado usar un recipiente de reacción de las mismas proporciones pero con capacidad mayor de un litro, con el fin de obtener un volumen de agua suficiente para el análisis y la extracción química. De este modo se obtendrán concentraciones más elevadas en el extracto acuoso y, por ende, una determinación analítica más fiable. En el apéndice 1 figura una tabla que recoge los cálculos del volumen mínimo necesario, el LOD de la sustancia, su log POW estimado y su hidrosolubilidad. La tabla se basa en la relación entre el log POW y el cociente de solubilidades en octanol y agua, tal como ha sido definida por Pinsuwan *et al.* (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

donde:

$SR = S_{oct}/S_w$ (en molaridad);

y en la relación establecida por Lyman (15) para predecir la hidrosolubilidad. Los valores de hidrosolubilidad calculados según la ecuación que se indica en el apéndice 1 deben considerarse una primera estimación. Conviene señalar que el usuario tiene libertad para hacer su propia estimación de la hidrosolubilidad por medio de cualquier ecuación que a su criterio represente mejor la relación entre hidrofobicidad y solubilidad. Cuando se trata de compuestos sólidos, por ejemplo, se recomienda tener en cuenta el punto de fusión en la predicción de la solubilidad. En caso de aplicar una ecuación modificada, habrá que cerciorarse de que sigue siendo válida la ecuación para el cálculo de la solubilidad en octanol. En el apéndice 2 se ha representado esquemáticamente una cubeta de agitación con camisa de vidrio de aprox. un litro de capacidad. Las proporciones del recipiente representado en el apéndice 2 han demostrado ser adecuadas, por lo que deben mantenerse aunque se utilicen recipientes de distinto tamaño;

— es fundamental disponer de algún medio para mantener constante la temperatura durante el ensayo de agitación lenta.

18. Los recipientes serán de material inerte para que la adsorción a sus paredes resulte despreciable.

**Preparación de las soluciones del ensayo**

19. La determinación del $P_{OW}$ se efectuará con el 1-octanol de la máxima pureza comercialmente disponible (como mínimo + 99 %). Se recomienda purificar el 1-octanol por extracción con ácido, álcali y agua y posterior desecación. Se puede emplear además la destilación para purificar el 1-octanol. El 1-octanol purificado servirá para preparar soluciones patrón de las sustancias problema. En la determinación del $P_{OW}$ se empleará agua destilada procedente de un aparato de cristal o de cuarzo o agua procedente de un sistema de purificación; también se podrá utilizar agua de calidad analítica para CLAR. El agua destilada se habrá filtrado por un filtro de 0,22 μm, y se emplearán blancos para descartar la presencia de impurezas en los extractos concentrados que pudieran interferir con la sustancia problema. Si se emplea un filtro de fibra de vidrio, se limpiará calentándolo en horno a 400 °C durante tres horas como mínimo.

20. Los dos disolventes se habrán saturado recíprocamente antes del ensayo, dejándolos equilibrar en un recipiente con suficiente capacidad. Esto se consigue mediante agitación lenta del sistema bifásico durante dos días.

21. Se tomará una cantidad adecuada de la sustancia problema y se disolverá 1-octanol (saturado con agua). El coeficiente de reparto 1-octanol/agua se ha de determinar en soluciones diluidas en estos dos elementos. Por lo tanto, la concentración de la sustancia problema no debe exceder del 70 % de su solubilidad ni rebasar un máximo de 0,1 M en cualquiera de las fases (1). Las soluciones de 1-octanol empleadas en el ensayo estarán exentas de partículas sólidas de la sustancia problema en suspensión.

22. Se tomará una cantidad adecuada de la sustancia problema y se disolverá en 1-octanol (saturado con agua). Si el log $P_{OW}$ estimado es superior a 5, habrá que cerciorarse de que las soluciones de 1-octanol empleadas en el ensayo están exentas de sustancia problema sólida en suspensión. A tal fin, cuando se analicen compuestos químicos con un log $P_{OW}$ estimado > 5 se seguirá el procedimiento siguiente:

— disolver la sustancia problema en 1-octanol (saturado con agua),

▼M4

— dejar la solución en reposo el tiempo suficiente para que sedimente el material sólido en suspensión; durante la fase de sedimentación, comprobar la concentración de la sustancia problema,

— cuando las concentraciones medidas en la solución de 1-octanol hayan alcanzado valores estables, diluir la solución madre con un volumen adecuado de 1-octanol,

— determinar la concentración de la solución madre diluida. Si la concentración medida es coherente con la dilución, la solución madre diluida se podrá emplear en el ensayo de agitación lenta.

**Extracción y análisis de las muestras**

23. Para el análisis de la sustancia problema se empleará un método analítico validado. Los investigadores deberán aportar pruebas de que las concentraciones alcanzadas durante el ensayo, tanto en la fase de 1-octanol saturado con agua como en la de agua saturada con 1-octanol, están por encima del límite de cuantificación de los métodos analíticos empleados. Cuando sea necesario aplicar métodos de extracción, habrá que establecer con anterioridad al ensayo las recuperaciones analíticas de la sustancia problema a partir de la fase acuosa y de la fase de 1-octanol. La señal analítica deberá ser corregida con blancos y se extremarán las precauciones para evitar la transferencia del analito de una muestra a otra.

24. Es probable que antes del análisis haya que proceder a la extracción de la fase acuosa con un disolvente orgánico y a la preconcentración del extracto, por cuanto se dan concentraciones excesivamente bajas de las sustancias problema hidrófobas en la fase acuosa. Por la misma razón habrá que reducir las concentraciones que puedan resultar en el blanco. Para este fin es necesario usar disolventes de alta pureza, preferiblemente específicos para análisis de residuos. Por lo demás, el uso de material de vidrio escrupulosamente limpio(por ejemplo, mediante lavado con solvente o calentamiento en horno a alta temperatura) ayudará a evitar la contaminación cruzada.

25. Se puede obtener una estimación del log $P_{OW}$ con ayuda de un programa informático o mediante la valoración de un experto. Si su valor es mayor de seis, habrá que supervisar estrechamente las correcciones con el blanco y las transferencias de analito. Además, si la estimación de log $P_{OW}$ es superior a seis, es obligado el uso de un patrón análogo para corregir los valores de recuperación, a fin de obtener factores de preconcentración elevados. Existen varios programas informáticos comerciales ([1]) para la estimación de log $P_{OW}$, como Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) y ACD log P (19). En la bibliografía (20-22) se ofrecen descripciones de los métodos de estimación.

26. Los límites de cuantificación (LOQ) para la determinación de la sustancia problema en 1-octanol y agua se establecen sobre la base de métodos aceptados. Como regla general, el límite de cuantificación del método se puede determinar como la concentración en agua o 1-octanol que produce una relación señal/ruido igual a diez. Se elegirá un método adecuado de extracción y preconcentración, además de especificar las recuperaciones analíticas. Se elegirá un factor de preconcentración adecuado a fin de obtener una señal de la intensidad necesaria para la determinación analítica.

([1]) Esta información se facilita exclusivamente para mayor comodidad del usuario. Se pueden utilizar otros programas informáticos siempre que se demuestre que dan lugar a los mismos resultados.

▼M4

27. Sobre la base de los parámetros del método analítico y de las concentraciones esperadas, se determina el tamaño de muestra aproximado que hace falta para determinar con exactitud la concentración de la sustancia. Se evitará emplear muestras de agua demasiado reducidas como para obtener una señal analítica suficiente. Por otro lado, se evitará también el uso de muestras de agua excesivamente voluminosas, pues de otro modo podría quedar una cantidad insuficiente para el número mínimo de análisis que se necesitan (n = 5). En el apéndice 1 se indica el volumen mínimo de muestra en función de la capacidad del recipiente, del LOD de la sustancia problema y de su solubilidad.

28. La cuantificación de las sustancias problema se realiza por comparación con las curvas de calibración del compuesto correspondiente. Las concentraciones halladas en las muestras analizadas deberán estar comprendidas entre las concentraciones de los patrones.

29. En caso de sustancias problema con un log $P_{OW}$ estimado superior a seis, se añadirá un patrón análogo a la muestra de agua antes de la extracción con el fin de registrar las pérdidas ocurridas durante la extracción y la preconcentración de las muestras de agua. Para poder corregir exactamente los valores de recuperación, los análogos deberán tener propiedades muy similares o idénticas a las de la sustancia problema. Con este propósito se usan preferiblemente análogos isotópicamente marcados (estables) de las sustancias de interés (por ejemplo, perdeuterados o marcados con $^{13}C$). Cuando no sea posible el uso de isótopos marcados estables, como $^{13}C$ o $^{2}H$, habrá que demostrar con datos fidedignos de la bibliografía que las propiedades fisicoquímicas del análogo son muy semejantes a las de la sustancia problema. Durante la extracción líquido-líquido de la fase acuosa se pueden formar emulsiones. Es posible reducirlas añadiendo una sal y dejando que la emulsión repose hasta el día siguiente. Es preciso documentar los métodos empleados para la extracción y preconcentración de las muestras.

30. Las muestras extraídas de la fase de 1-octanol se pueden, en caso necesario, diluir con un disolvente apropiado antes de su análisis. Por lo demás, se recomienda usar patrones análogos para corregir los valores de recuperación de aquellas sustancias que, en los ensayos de recuperación, han mostrado un alto grado de variabilidad (desviación típica relativa > 10 %).

31. El método analítico se documentará detalladamente. La documentación se refiere a: método de extracción, factores de preconcentración y de dilución, parámetros instrumentales, procedimiento habitual de calibración, intervalo de calibración, recuperación analítica de la sustancia problema a partir del agua, adición de patrones análogos para corregir los valores de recuperación, valores del blanco, límites de detección y límites de cuantificación.

**Realización del ensayo**

*Relación óptima de volúmenes 1-octanol/agua*

32. Para decidir qué volúmenes de agua y 1-octanol se van a emplear, hay que tener en cuenta el LOQ en 1-octanol y en agua, los factores de preconcentración aplicados a las muestras acuosas, el volumen de muestreo en 1-octanol y en agua, y las concentraciones esperadas. Por razones experimentales, en el sistema de agitación lenta el volumen de 1-octanol ha de elegirse de manera que la capa de este solvente sea lo bastante espesa (> 0,5 cm) para permitir la toma de muestras de la fase de 1-octanol sin alterarla.

33. En el análisis de compuestos con log $P_{OW}$ de 4,5 o superior, la proporción típica entre fases es de 20 a 50 ml de 1-octanol por 950 a 980 ml de agua en un recipiente de un litro.

▼**M4**

*Condiciones del ensayo*

34. Durante el ensayo, el recipiente de reacción se mantiene termostatizado para reducir la variación de temperatura a menos de 1 °C. El ensayo se efectuará a 25 °C.

35. El sistema experimental deberá protegerse de la luz diurna, ya sea procediendo en una sala oscura, ya cubriendo el recipiente de reacción con lámina de aluminio.

36. El ensayo se realizará (en la medida de lo posible) en un ambiente limpio de polvo.

37. El sistema de 1-octanol/agua se agita hasta alcanzar el equilibrio. En un ensayo piloto, se establece la duración del período de equilibrado realizando una operación de agitación lenta y tomando periódicamente muestras de agua y 1-octanol. Los tiempos de muestreo estarán separados por un lapso de cinco horas como mínimo.

38. Cada determinación de $P_{OW}$ se basará al menos en tres ensayos de agitación lenta independientes.

*Determinación del tiempo de equilibrado*

39. Se supone que se alcanza el equilibrio cuando la curva de regresión del cociente de concentraciones 1-octanol/agua en función del tiempo, representada a lo largo de cuatro momentos de muestreo, arroja una pendiente que no es significativamente diferente de cero a un nivel de p de 0,05. El tiempo de equilibrado será como mínimo un día antes de comenzar el muestreo. Como norma general, el muestreo de sustancias con un log $P_{OW}$ estimado inferior a cinco puede efectuarse durante los días dos y tres. Los compuestos más hidrófobos pueden necesitar un equilibrado más prolongado. En el caso de una sustancia con log $P_{OW}$ de 8,23 (decaclorobifenilo), fueron suficientes 144 horas para llegar al equilibrio. Este se establece mediante muestreo repetido a partir de un único recipiente.

*Inicio del ensayo*

40. Al iniciar el ensayo, se llena el recipiente de reacción con agua saturada de 1-octanol. Se deja tiempo suficiente hasta alcanzar la temperatura termostatizada.

41. Se toma la cantidad deseada de sustancia problema (disuelta en el volumen necesario de 1-octanol saturado con agua) y se añade cuidadosamente al recipiente de reacción. Este es un paso crucial del ensayo, en el que hay que evitar la mezcla turbulenta de las dos fases. A tal fin, se puede pipetear lentamente la fase de 1-octanol contra la pared del vaso experimental, cerca de la superficie del agua. Acto seguido fluirá por la pared de vidrio para formar una película sobre la fase acuosa. Se evitará en todo caso la decantación del 1-octanol directamente en el matraz; se procurará que no caigan gotas de 1-octanol directamente en el agua.

42. Después de comenzar la agitación, se aumenta suavemente su velocidad. Si no se pudieran ajustar debidamente los motores de agitación habría que considerar el uso de un transformador. La velocidad de agitación se ajusta de modo que se cree un vórtice en la interfase entre el agua y el 1-octanol con una profundidad de 0,5 cm a 2,5 cm como máximo. Si se sobrepasa esta profundidad de 2,5 cm, habrá que reducir la velocidad de agitación; de lo contrario pueden formarse microgotas a partir de las gotitas de 1-octanol en la fase acuosa, lo que llevaría a sobrevalorar la concentración de la sustancia problema en el agua. Esta velocidad de agitación máxima que corresponde a 2,5 cm de profundidad se recomienda teniendo en cuenta los resultados del estudio de validación interlaboratorios (5). Se trata de una solución intermedia entre conseguir un equilibrado rápido y limitar la formación de microgotas de 1-octanol.

▼M4

*Muestreo y tratamiento de las muestras*

43. Antes de proceder al muestreo, se apaga el agitador y se espera a que los líquidos estén en reposo. Al finalizar el muestro se vuelve a poner en marcha el agitador a velocidad lenta, como se describe anteriormente, y después se aumenta poco a poco la velocidad.

44. Las muestras de la fase acuosa se toman de un grifo ubicado en el fondo del recipiente de reacción. Hay que desechar siempre el volumen muerto de agua contenido en los grifos (alrededor de 5 ml en el recipiente descrito en el apéndice 2). El agua contenida en los grifos no sufre agitación y, por lo tanto, no está en equilibrio con el resto de líquido. Se anota el volumen de las muestras de agua, verificando que la cantidad de sustancia problema presente en el agua desechada se ha tenido en cuenta al determinar el balance de masa. Las pérdidas por evaporación se reducen al mínimo dejando que el agua fluya suavemente por el embudo de decantación, evitando perturbaciones de la capa de agua/1-octanol.

45. Las muestras de 1-octanol se obtienen tomando una pequeña alícuota (aprox. 100 µl) de la capa de 1-octanol con una jeringa de 100 microlitros compuesta enteramente de vidrio y metal. Se procurará no perturbar la superficie de interfase. Se anota el volumen del líquido muestreado. Basta una pequeña alícuota, puesto que la muestra de 1-octanol se va a diluir.

46. Es conveniente evitar transferencias innecesarias de la muestra. Por esta razón el volumen de muestra debe determinarse gravimétricamente. En el caso de las muestras acuosas, esto se consigue recogiéndolas en un embudo de decantación que contenga ya el volumen necesario de disolvente.

DATOS E INFORME

47. En el presente método de ensayo, el $P_{OW}$ se determina a partir de tres ensayos de agitación lenta (tres unidades experimentales) realizados con el compuesto en investigación en idénticas condiciones. La curva de regresión que sirve para demostrar que se ha alcanzado el equilibrio deberá basarse en los resultados de al menos cuatro determinaciones de $C_o/C_w$ correspondientes a momentos de muestreo consecutivos. Ello permite calcular la varianza como medida de la incertidumbre del valor medio obtenido por cada unidad experimental.

48. El $P_{OW}$ queda definido por la varianza de los datos obtenidos por cada unidad experimental. Esta información sirve para calcular el $P_{OW}$ como media ponderada de los resultados de las unidades experimentales individuales. Así, la inversa de la varianza de los resultados obtenidos por las unidades experimentales sirve como factor de ponderación. De este modo los datos con una gran variación (expresada como varianza) y, por ende, con menor fiabilidad, influyen menos en el resultado que los datos con escasa varianza.

49. De manera análoga se calcula la desviación típica ponderada. Refleja la repetibilidad de las mediciones de $P_{OW}$. Una desviación típica ponderada reducida indica que la determinación del $P_{OW}$ tiene alta repetibilidad dentro del laboratorio. A continuación se expone el tratamiento estadístico formal de los datos.

▼M4

**Tratamiento de los resultados**

*Demostración de que se ha alcanzado el equilibrio*

50. Por cada momento de muestreo se calcula el logaritmo del cociente de concentraciones de la sustancia problema en 1-octanol y en agua [log ($C_O$/$C_w$)]. Se demuestra que se ha alcanzado el equilibrio químico llevando a una gráfica dicho cociente en función del tiempo. Una meseta en esta gráfica a lo largo de al menos cuatro momentos de medición consecutivos indica que se ha alcanzado el equilibrio, y que el compuesto se ha disuelto realmente en el 1-octanol. De no ser así, habrá que proseguir el ensayo hasta que cuatro puntos de medición consecutivos arrojen una pendiente que no difiera significativamente de cero a un nivel p de 0,05, lo que indica que log $C_o/C_w$ es independiente del tiempo.

*Cálculo de log $P_{OW}$*

51. El valor de log $P_{OW}$ de la unidad experimental se calcula como la media ponderada de log $C_o/C_w$ correspondiente a la zona de la curva de log $C_o/C_w$ en función del tiempo en la que se ha demostrado el estado de equilibrio. La media ponderada se calcula ponderando los datos con la inversa de la varianza, de modo que la influencia de los datos en el resultado final sea inversamente proporcional a su incertidumbre.

*Media de log $P_{OW}$*

52. Se calcula el valor de log $P_{OW}$ como la media de los resultados de las unidades experimentales individuales ponderados con sus respectivas varianzas.

El cálculo es el siguiente:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

donde:

$\log P_{OW,i}$ = valor de log $P_{OW}$ de la unidad experimental individual i;

$\log P_{OW,Av}$ = media ponderada de las determinaciones de log $P_{OW}$ individuales;

$w_i$ = peso estadístico atribuido al valor de log $P_{OW}$ de la unidad experimental i.

Como $w_i$ se toma la inversa de la varianza de log $P_{OW,i}$ ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Se estima el error de la media de log $P_{OW}$ como la repetibilidad de log $C_o/C_w$ determinado durante la fase de equilibrio en las unidades experimentales individuales. Este se expresa como la desviación típica ponderada de log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log\ Pow,Av}$), que a su vez da una medida del error asociado a log $P_{OW,Av}$. La desviación típica ponderada se puede calcular a partir de la varianza ponderada ($var_{\log\ Pow,Av}$) del modo siguiente:

$$var_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (var_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Donde n representa el número de unidades experimentales.

▼M4

**Informe del ensayo**

54. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la posición del marcador si se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés (véase el punto 17),

— pureza (impurezas) de la sustancia problema,

— pureza radioquímica de las sustancias marcadas y actividad molar (si procede),

— estimación preliminar de log POW, además del método aplicado para obtener su valor.

*Condiciones del ensayo:*

— fechas de realización de los estudios,

— temperatura durante el ensayo,

— volúmenes de 1-octanol y agua al inicio del ensayo,

— volúmenes de las muestras tomadas de 1-octanol y agua,

— volúmenes de 1-octanol y agua que quedan en los recipientes de ensayo,

— descripción de los recipientes de ensayo y las condiciones de agitación (dimensiones de la barra agitadora y del recipiente de ensayo, altura del vórtice en mm y, cuando se conozca, velocidad de agitación) empleadas,

— procedimientos analíticos aplicados para determinar la sustancia problema y el límite de cuantificación del método,

— tiempos de muestreo,

— pH de la fase acuosa y soluciones amortiguadoras empleadas cuando se ajusta el pH (en caso de moléculas ionizables),

— número de réplicas.

*Resultados:*

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,

— concentraciones medidas de la sustancia problema en 1-octanol y en agua en función del tiempo,

— demostración del balance de masa,

— temperatura y desviación típica o intervalo de temperaturas durante el ensayo,

— recta de regresión del cociente de concentraciones en función del tiempo,

— valor medio de log $P_{ow,Av}$ y su error típico,

— discusión e interpretación de los resultados,

▼M4

— ejemplos de datos en bruto de los análisis representativos (todos los datos en bruto tienen que almacenarse de conformidad con las normas de BPL), entre ellos los índices de recuperación de los análogos y el número de concentraciones tomadas para la calibración (además de los criterios para definir el coeficiente de correlación de la curva de calibración), y resultados de garantía de calidad/control de calidad (QA/QC),

— cuando estén disponibles: informe de validación del método de ensayo (con indicación de su referencia bibliográfica).

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the «slow-stirring» method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.

(2) Capítulo A.8 del presente anexo. Coeficiente de reparto.

(3) Capítulo A.8 del presente anexo. Coeficiente de reparto.

(4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.

(5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (POW) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

(6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

(7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

(8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. Environ. Sci. Technol. 31: 2596-2602.

(9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.

(10) Capítulo A.6 del presente anexo. Hidrosolubilidad.

(11) Capítulo C.7 del presente anexo. Degradación — Degradación abiótica: hidrólisis en función del pH.

(12) Capítulo C.4-Partes II – VII (métodos A a F) del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

(13) Capítulo A.4 del presente anexo. Presión de vapor.

(14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, J. Chem. Eng. Data. 40: 623-626.

(15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 to 2-52.

(16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

(17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

(18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.

(19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

(20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, Handbook of chemical property estimation, American Chemical Society, Washington, D.C.

(21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 14: 479-488.

(22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, Methoden der Organischen Chemie: 386-390.

▼M4

*Apéndice 1*

**Hoja para el cálculo de los volúmenes mínimos de agua necesarios para la detección de sustancias problema con diferentes valores de log $P_{OW}$ en fase acuosa**

Hipótesis:

— Volumen máximo de las alícuotas individuales = 10 % del volumen total; 5 alícuotas = 50 % del volumen total.

— Concentración de las sustancias problema = 0,7 × solubilidad en cada fase. Si las concentraciones son más bajas, se necesitarán volúmenes mayores.

— Volumen empleado para la determinación del LOD = 100 ml.

— Las correspondencias entre log $P_{ow}$ y log $S_w$ y entre log $P_{ow}$ y SR ($S_{oct}/S_w$) expresan aceptablemente las relaciones que se dan en las sustancias problema.

*Estimación de $S_w$*

| log $P_{ow}$ | Ecuación | log $S_w$ | $S_w$ (mg/l) |
|---|---|---|---|
| 4 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | 0,496 | 3,133E+00 |
| 4,5 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | 0,035 | 1,084E+00 |
| 5 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | –0,426 | 3,750E-01 |
| 5,5 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | –0,887 | 1,297E-01 |
| 6 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | –1,348 | 4,487E-02 |
| 6,5 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | –1,809 | 1,552E-02 |
| 7 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | –2,270 | 5,370E-03 |
| 7,5 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | –2,731 | 1,858E-03 |
| 8 | $(-)0{,}922 \times \log P_{ow} + 4{,}184$ | –3,192 | 6,427E-04 |

*Estimación de $S_{oct}$*

| log $P_{ow}$ | Ecuación | $S_{oct}$ (mg/l) |
|---|---|---|
| 4 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}41$ | 3,763E+04 |
| 4,5 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}42$ | 4,816E+04 |
| 5 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}43$ | 6,165E+04 |
| 5,5 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}44$ | 7,890E+04 |
| 6 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}45$ | 1,010E+05 |
| 6,5 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}46$ | 1,293E+05 |
| 7 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}47$ | 1,654E+05 |
| 7,5 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}48$ | 2,117E+05 |
| 8 | $\log P_{ow} = 0{,}88 \log SR + 0{,}49$ | 2,710E+05 |

▼**M4**

| Masa total de sustancia problema (mg) | $Masa_{oct}/Masa_{agua}$ | $Masa_{H2O}$ (mg) | $Conc_{H2O}$ (mg/l) | $Masa_{oct}$ (mg) | $Conc_{oct}$ (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 319 | 526 | 2,5017 | 2,6333 | 1 317 | 26 333 |
| 1 686 | 1 664 | 1,0127 | 1,0660 | 1 685 | 33 709 |
| 2 158 | 5 263 | 0,4099 | 0,4315 | 2 157 | 43 149 |
| 2 762 | 16 644 | 0,1659 | 0,1747 | 2 762 | 55 230 |
| 3 535 | 52 632 | 0,0672 | 0,0707 | 3 535 | 70 691 |
| 4 524 | 1664 36 | 0,0272 | 0,0286 | 4 524 | 90 480 |
| 5 790 | 5263 16 | 0,0110 | 0,0116 | 5 790 | 115 807 |
| 7 411 | 1 664 357 | 0,0045 | 0,0047 | 7 411 | 148 223 |
| 9 486 | 5 263 158 | 0,0018 | 0,0019 | 9 486 | 189 713 |

*Cálculo de los volúmenes*

**Volumen mínimo de fase acuosa necesario por cada concentración límite de detección**

| $\log K_{ow}$ | LOD (microgramos/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | | 0,04 | 0,38 | 3,80 | 38 | 380 |
| 4,5 | | 0,09 | 0,94 | 9,38 | 94 | 938 |
| 5 | | 0,23 | 2,32 | 23,18 | 232 | 2 318 |
| 5,5 | | 0,57 | 5,73 | 57,26 | 573 | 5 726 |
| 6 | | 1,41 | 14,15 | 141 | 1 415 | 14 146 |
| 6,5 | | 3,50 | 34,95 | 350 | 3 495 | 34 950 |
| 7 | | 8,64 | 86,35 | 864 | 8 635 | 86 351 |
| 7,5 | | 21,33 | 213 | 2 133 | 21 335 | 213 346 |
| 8 | | 52,71 | 527 | 5 271 | 52 711 | 527 111 |
| Volumen empleado para determinar el LOD (litros) | 0,1 | | | | | |

*Leyendas de los cálculos:*

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 1 litro.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 2 litros.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 5 litros.

Representa < 10 % del volumen total de la fase acuosa; recipiente de equilibrado de 10 litros.

Sobrepasa incluso el 10 % del recipiente de equilibrado de 10 litros.

▼**M4**

**Representación de los volúmenes necesarios en función de la hidrosolubilidad y del log $P_{ow}$**

Volumen mínimo de fase acuosa necesario por cada concentración límite de detección (ml)

| log $P_{ow}$ | $S_w$ (mg/l) | LOD (microgramos/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 10 | | 0,01 | 0,12 | 1,19 | 11,90 | 118,99 |
| | 5 | | 0,02 | 0,24 | 2,38 | 23,80 | 237,97 |
| | 3 | | 0,04 | 0,40 | 3,97 | 39,66 | 396,62 |
| | 1 | | 0,12 | 1,19 | 11,90 | 118,99 | 1 189,86 |
| 4,5 | 5 | | 0,02 | 0,20 | 2,03 | 20,34 | 203,37 |
| | 2 | | 0,05 | 0,51 | 5,08 | 50,84 | 508,42 |
| | 1 | | 0,10 | 1,02 | 10,17 | 101,68 | 1 016,83 |
| | 0,5 | | 0,20 | 2,03 | 20,34 | 203,37 | 2 033,67 |
| 5 | 1 | | 0,09 | 0,87 | 8,69 | 86,90 | 869,01 |
| | 0,5 | | 0,17 | 1,74 | 17,38 | 173,80 | 1 738,02 |
| | 0,375 | | 0,23 | 2,32 | 23,18 | 231,75 | 2 317,53 |
| | 0,2 | | 0,43 | 4,35 | 43,45 | 434,51 | 4 345,05 |
| 5,5 | 0,4 | | 0,19 | 1,86 | 18,57 | 185,68 | 1 856,79 |
| | 0,2 | | 0,37 | 3,71 | 37,14 | 371,36 | 3 713,59 |
| | 0,1 | | 0,74 | 7,43 | 74,27 | 742,72 | 7 427,17 |
| | 0,05 | | 1,49 | 14,85 | 148,54 | 1 485,43 | 14 854,35 |
| 6 | 0,1 | | 0,63 | 6,35 | 63,48 | 634,80 | 6 347,95 |
| | 0,05 | | 1,27 | 12,70 | 126,96 | 1 269,59 | 12 695,91 |
| | 0,025 | | 2,54 | 25,39 | 253,92 | 2 539,18 | 25 391,82 |
| | 0,0125 | | 5,08 | 50,78 | 507,84 | 5 078,36 | 50 783,64 |
| 6,5 | 0,025 | | 2,17 | 21,70 | 217,02 | 2 170,25 | 21 702,46 |
| | 0,0125 | | 4,34 | 43,40 | 434,05 | 4 340,49 | 43 404,93 |
| | 0,006 | | 9,04 | 90,43 | 904,27 | 9 042,69 | 90 426,93 |
| | 0,003 | | 18,09 | 180,85 | 1 808,54 | 18 085,39 | 180 853,86 |
| 7 | 0,006 | | 7,73 | 77,29 | 772,89 | 7 728,85 | 77 288,50 |
| | 0,003 | | 15,46 | 154,58 | 1 545,77 | 15 457,70 | 154 577,01 |
| | 0,0015 | | 23,19 | 231,87 | 2 318,66 | 23 186,55 | 231 865,51 |
| | 0,001 | | 46,37 | 463,73 | 4 637,31 | 46 373,10 | 463 731,03 |
| 7,5 | 0,002 | | 19,82 | 198,18 | 1 981,77 | 19 817,73 | 198 177,33 |
| | 0,001 | | 39,64 | 396,35 | 3 963,55 | 39 635,47 | 396 354,66 |
| | 0,0005 | | 79,27 | 792,71 | 7 927,09 | 79 270,93 | 792 709,32 |

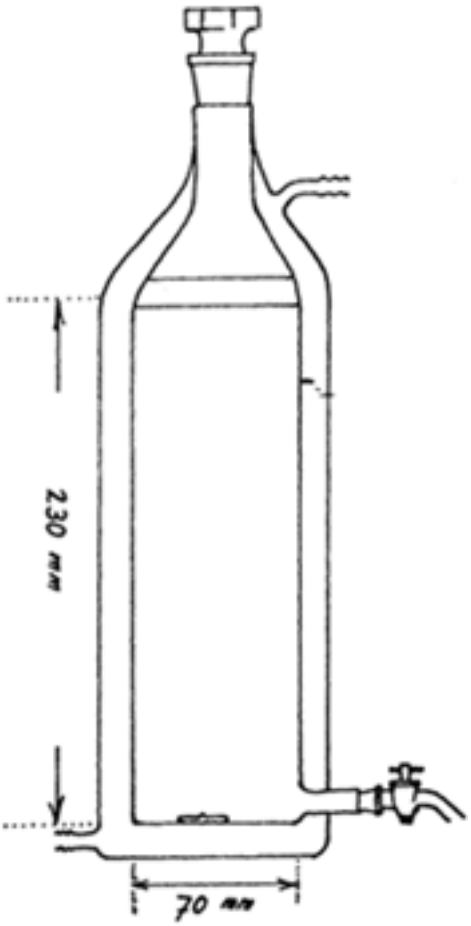
▼**M4**

| log $P_{ow}$ | $S_w$ (mg/l) | LOD (microgramos/l)→ | 0,001 | 0,01 | 0,10 | 1,00 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,00025 | | 158,54 | 1 585,42 | 15 854,19 | 158 541,86 | 1 585 418,63 |
| 8 | 0,001 | | 33,88 | 338,77 | 3 387,68 | 33 876,77 | 338 767,72 |
| | 0,0005 | | 67,75 | 677,54 | 6 775,35 | 67 753,54 | 677 535,44 |
| | 0,00025 | | 135,51 | 1 355,07 | 13 550,71 | 135 507,09 | 1 355 070,89 |
| | 0,000125 | | 271,01 | 2 710,14 | 27 101,42 | 271 014,18 | 2 710 141,77 |
| Volumen empleado para determinar el LOD (litros) | | 0,1 | | | | | |

▼**M4**

*Apéndice 2*

**Ejemplo de recipiente con camisa de vidrio empleado en el ensayo de agitación lenta para la determinación del $P_{ow}$**



▼M6

## A.24. COEFICIENTE DE REPARTO (N-OCTANOL/AGUA), MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 117 (2004).

1. El coeficiente de reparto (P) se define como la relación de las concentraciones en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes considerablemente inmiscibles. En el caso del n-octanol y del agua:

$$P_{ow} = \frac{C_n - \text{octanol}}{C_{\text{agua}}}$$

Como el coeficiente de reparto es el cociente de dos concentraciones, carece de dimensiones y se indica generalmente en forma de su logaritmo decimal.

2. El $P_{ow}$ es un parámetro clave en los estudios sobre el destino en el medio ambiente de las sustancias. Se ha comprobado que existe una relación muy significativa entre el $P_{ow}$ de la forma no ionizada de las sustancias y su bioacumulación en los peces. También se ha demostrado que el $P_{ow}$ es un parámetro útil en la predicción de la adsorción al suelo y a los sedimentos, y para establecer relaciones cuantitativas estructura/actividad en una amplia gama de efectos biológicos.

3. La propuesta original del presente método de ensayo se basaba en un artículo de C.V. Eadsforth y P. Moser (1). El desarrollo del método de ensayo y un ensayo de comparación interlaboratorios de la OCDE fueron coordinados por el Umweltbundesamt de la República Federal de Alemania en 1986 (2).

CONSIDERACIONES INICIALES

4. Pueden determinarse empíricamente valores de log $P_{ow}$ en el intervalo de –2 a 4 (a veces, hasta 5 y más) ([1]) por el método de frasco de agitación (capítulo A.8 del presente anexo, TG 107 de la OCDE). El método de HPLC cubre el log $P_{ow}$ en el intervalo de 0 a 6 (1)(2)(3)(4)(5). Este método puede exigir una estimación del $P_{ow}$ para asignar las sustancias de referencia adecuadas y apoyar las eventuales conclusiones a las que se llegue a partir de los datos generados en el ensayo. Los métodos de cálculo se tratan brevemente en el apéndice del presente método de ensayo. El modo de funcionamiento de la HPLC es isocrático.

5. Los valores de $P_{ow}$ dependen de las condiciones ambientales, como la temperatura, el pH, la fuerza iónica, etc., y estas deben estar definidas en el experimento para que los datos de $P_{ow}$ se puedan interpretar correctamente. Cuando se trate de sustancias ionizables, puede disponerse de otro método [por ejemplo, el proyecto de directrices de la OCDE sobre un método pH-métrico para sustancias ionizadas (6)], que podría utilizarse como método alternativo. Aunque dicho proyecto de directrices de la OCDE puede ser adecuado para determinar el $P_{ow}$ de esas sustancias ionizables, en algunos casos es más conveniente utilizar el método de HPLC a un pH pertinente para el medio ambiente (véase el punto 9).

([1]) Se da un límite superior por la necesidad de lograr una fase de separación completa después de ajustar el equilibrio del reparto y antes de tomar muestras para las determinaciones analíticas. Si se presta la atención apropiada, el límite superior puede ampliarse a valores superiores de $P_{ow}$.

▼**M6**

PRINCIPIO DEL MÉTODO

6. La HPLC de fase inversa se realiza en columnas analíticas rellenas de una fase sólida comercial con cadenas hidrocarbonadas largas (C8, C18, por ejemplo) unidas por enlaces químicos a la sílice.

7. Las sustancias inyectadas en una de estas columnas se reparten entre la fase de disolvente móvil y la fase estacionaria de hidrocarburos, y son transportadas a lo largo de la columna por la fase móvil. Las sustancias se retienen en función de su coeficiente de reparto hidrocarburo-agua, de manera que en primer lugar eluyen las sustancias hidrófilas y en último lugar las sustancias lipófilas. El tiempo de retención se describe mediante el factor de capacidad k, dado por la expresión:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

donde $t_R$ es el tiempo de retención de la sustancia problema, y $t_0$ es el tiempo muerto, es decir, el tiempo medio que tarda en atravesar la columna una molécula de disolvente. No es necesario utilizar métodos analíticos cuantitativos, sino solo determinar los tiempos de retención.

8. El coeficiente de reparto octanol/agua de una sustancia problema puede calcularse mediante la determinación experimental de su factor de capacidad k, que se introduce a continuación en la ecuación siguiente:

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

donde

a, b = coeficientes de regresión lineal.

La ecuación anterior puede obtenerse por regresión lineal del logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua de sustancias de referencia frente al logaritmo de los factores de capacidad de las sustancias de referencia.

9. El método de HPLC de fase inversa permite la estimación de coeficientes de reparto en el intervalo de log $P_{ow}$ entre 0 y 6, pero en casos excepcionales puede ampliarse para cubrir el intervalo de log $P_{ow}$ entre 6 y 10. Esto puede requerir que se modifique la fase móvil (3). El método no es aplicable a los ácidos y bases fuertes, a los complejos metálicos, a las sustancias que reaccionen con el eluyente, ni a los agentes tensioactivos. Con las sustancias ionizables pueden realizarse mediciones en su forma no ionizada (ácido libre o base libre) solo utilizando un amortiguador adecuado con un pH por debajo del $pK_a$ en caso de un ácido libre, o por encima del $pK_a$ si se trata de una base libre. Si se llegara a disponer del método pH-métrico para el ensayo de sustancias ionizables (6), se podría utilizar como método alternativo. Si se determina el valor de log $P_{ow}$ para utilizarlo en la clasificación de los peligros para el medio ambiente o en la evaluación del riesgo para el medio ambiente, el ensayo debe realizarse en el intervalo de pH pertinente para el medio natural, es decir, en el intervalo de pH de 5,0 a 9.

10. Las impurezas pueden hacer en algunos casos que la interpretación de los resultados sea difícil debido a la incertidumbre en la asignación de los picos. En el caso de mezclas que den lugar a una banda sin resolver, deben indicarse los límites superior e inferior de log $P_{ow}$, y el porcentaje del área de cada pico de log $P_{ow}$. En el caso de mezclas que sean un grupo de homólogos, deberá indicarse asimismo la media ponderada de log $P_{ow}$ (7), calculada sobre la base de los valores de los distintos $P_{ow}$ y los valores correspondientes de porcentaje del área (8). En el cálculo deben tomarse en consideración todos los picos a los que corresponda un área superior o igual al 5 % del área total de los picos (9):

▼**M6**

$$\textit{Media ponderada de } \log P_{ow} = \frac{\sum_i (\log P_{owi})(\%\ \textit{área})}{\%\ \textit{área total de los picos}} = \frac{\sum (\log P_{owi})(\%\ _i\textit{área})}{\sum_i \%\ \textit{área}}$$

La media ponderada de log $P_{ow}$ solo es válida en caso de sustancias o mezclas (por ejemplo, *tall oils*) compuestas por homólogos (como, por ejemplo, una serie de alcanos). Las mezclas pueden medirse con resultados significativos, a condición de que el detector analítico utilizado tenga la misma sensibilidad respecto a todas las sustancias de la mezcla y la resolución sea adecuada.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

11. Antes de utilizar el método, deben conocerse la constante de disociación, la fórmula estructural y la solubilidad en la fase móvil. Además, sería útil disponer de información sobre la hidrólisis.

CRITERIOS DE CALIDAD

12. Para aumentar la confianza de la medida, deben hacerse las determinaciones por duplicado.

— Repetibilidad: Los valores de log $P_{ow}$ derivados de las mediciones repetidas efectuadas en condiciones idénticas y utilizando el mismo conjunto de sustancias de referencia debe estar dentro de un intervalo de ± 0,1 unidades logarítmicas.

— Reproducibilidad: Si se repiten las mediciones con un conjunto diferente de sustancias de referencia, los resultados pueden ser diferentes. Típicamente, el coeficiente de correlación R correspondiente a la relación entre log k y log $P_{ow}$ de un conjunto de sustancias problema es de alrededor de 0,9, correspondiente a unos coeficientes de reparto octanol/agua de log $P_{ow}$ ± 0,5 unidades logarítmicas.

13. El ensayo comparativo interlaboratorios ha mostrado que con el método de HPLC pueden obtenerse valores de log $P_{ow}$ en el margen de ± 0,5 unidades de los valores obtenidos con el método de frasco de agitación (2). Pueden encontrarse otras comparaciones en la bibliografía (4) (5) (10) (11) (12). Las gráficas de correlación basadas en sustancias de referencia relacionadas estructuralmente dan los resultados más exactos (13).

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

14. Con el fin de correlacionar el factor de capacidad k medido de una sustancia con su $P_{ow}$, tiene que establecerse una curva de calibración utilizando al menos seis puntos (véase el punto 24). La selección de las sustancias de referencia adecuadas depende del criterio del analista. Las sustancias de referencia deben tener normalmente valores de log $P_{ow}$ que rodeen al log $P_{ow}$ de la sustancia problema, es decir, al menos una sustancia de referencia debe tener un $P_{ow}$ superior al de la sustancia problema y otra un $P_{ow}$ inferior al de la sustancia problema. La extrapolación debe utilizarse solo en casos excepcionales. Es preferible que estas sustancias de referencia estén relacionadas estructuralmente con la sustancia problema. Los valores de log $P_{ow}$ de las sustancias de referencia utilizados para la calibración deben basarse en datos experimentales fiables. No obstante, en el caso de sustancias con log $P_{ow}$ elevado (normalmente más de 4) podrán utilizarse valores calculados, a menos que se disponga de datos experimentales fiables. Si se utilizan valores extrapolados, se citará un valor límite.

15. Se dispone de amplias listas de valores de log $P_{ow}$ de muchos grupos de sustancias (14) (15). Si no se tienen datos sobre los coeficientes de reparto de sustancias relacionadas estructuralmente, puede utilizarse una calibración más general, establecida con otras sustancias de referencia. En el cuadro 1 se recogen sustancias de referencia recomendadas y sus valores de $P_{ow}$. En el caso de las sustancias ionizables, se dan los valores correspondientes a la forma no ionizada. En el ensayo comparativo interlaboratorios se comprobaron la verosimilitud y la calidad de los valores.

▼**M6**

*Cuadro 1.*

**Sustancias de referencias recomendadas**

| | Número CAS | Sustancia de referencia | log $P_{ow}$ | pKa |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 78-93-3 | 2-Butanona (metiletilcetona) | 0,3 | |
| 2 | 1122-54-9 | 4-Acetilpiridina | 0,5 | |
| 3 | 62-53-3 | Anilina | 0,9 | |
| 4 | 103-84-4 | Acetanilida | 1,0 | |
| 5 | 100-51-6 | Alcohol bencílico | 1,1 | |
| 6 | 150-76-5 | 4-Metoxifenol | 1,3 | pKa = 10,26 |
| 7 | 122-59-8 | Ácido fenoxiacético | 1,4 | pKa = 3,12 |
| 8 | 108-95-2 | Fenol | 1,5 | pKa = 9,92 |
| 9 | 51-28-5 | 2,4-Dinitrofenol | 1,5 | pKa = 3,96 |
| 10 | 100-47-0 | Benzonitrilo | 1,6 | |
| 11 | 140-29-4 | Fenilacetonitrilo | 1,6 | |
| 12 | 589-18-4 | Alcohol 4-metilbencílico | 1,6 | |
| 13 | 98-86-2 | Acetofenona | 1,7 | |
| 14 | 88-75-5 | 2-Nitrofenol | 1,8 | pKa = 7,17 |
| 15 | 121-92-6 | Ácido 3-nitrobenzoico | 1,8 | pKa = 3,47 |
| 16 | 106-47-8 | 4-Cloroanilina | 1,8 | pKa = 4,15 |
| 17 | 98-95-3 | Nitrobenceno | 1,9 | |
| 18 | 104-54-1 | Alcohol cinamílico (alcohol cinámico) | 1,9 | |
| 19 | 65-85-0 | Ácido benzoico | 1,9 | pKa = 4,19 |
| 20 | 106-44-5 | p-Cresol | 1,9 | pKa = 10,17 |
| 21 | 140-10-3 (trans) | Ácido cinámico | 2,1 | pKa = 3,89 (cis) 4,44 (trans) |
| 22 | 100-66-3 | Anisol | 2,1 | |
| 23 | 93-58-3 | Benzoato de metilo | 2,1 | |
| 24 | 71-43-2 | Benceno | 2,1 | |
| 25 | 99-04-7 | Ácido 3-metilbenzoico | 2,4 | pKa = 4,27 |
| 26 | 106-48-9 | 4-Clorofenol | 2,4 | pKa = 9,1 |
| 27 | 79-01-6 | Tricloroetileno | 2,4 | |
| 28 | 1912-24-9 | Atrazina | 2,6 | |
| 29 | 93-89-0 | Benzoato de etilo | 2,6 | |

▼**M6**

| | Número CAS | Sustancia de referencia | log $P_{ow}$ | pKa |
|---|---|---|---|---|
| 30 | 1194-65-6 | 2,6-Diclorobenzonitrilo | 2,6 | |
| 31 | 535-80-8 | Ácido 3-clorobenzoico | 2,7 | pKa = 3,82 |
| 32 | 108-88-3 | Tolueno | 2,7 | |
| 33 | 90-15-3 | 1-Naftol | 2,7 | pKa = 9,34 |
| 34 | 608-27-5 | 2,3-Dicloroanilina | 2,8 | |
| 35 | 108-90-7 | Clorobenceno | 2,8 | |
| 36 | 1746-13-0 | Éter de alilo y fenilo | 2,9 | |
| 37 | 108-86-1 | Bromobenceno | 3,0 | |
| 38 | 100-41-4 | Etilbenceno | 3,2 | |
| 39 | 119-61-9 | Benzofenona | 3,2 | |
| 40 | 92-69-3 | 4-Fenilfenol | 3,2 | pKa = 9,54 |
| 41 | 89-83-8 | Timol | 3,3 | |
| 42 | 106-46-7 | 1,4-Diclorobenceno | 3,4 | |
| 43 | 122-39-4 | Difenilamina | 3,4 | pKa = 0,79 |
| 44 | 91-20-3 | Naftaleno | 3,6 | |
| 45 | 93-99-2 | Benzoato de fenilo | 3,6 | |
| 46 | 98-82-8 | Isopropilbenceno | 3,7 | |
| 47 | 88-06-2 | 2,4,6-Triclorofenol | 3,7 | pKa = 6 |
| 48 | 92-52-4 | Bifenilo | 4,0 | |
| 49 | 120-51-4 | Benzoato de bencilo | 4,0 | |
| 50 | 88-85-7 | 2,4-Dinitro-6-sec-butilfenol | 4,1 | |
| 51 | 120-82-1 | 1,2,4-Triclorobenceno | 4,2 | |
| 52 | 143-07-7 | Ácido dodecanoico | 4,2 | pKa = 5,3 |
| 53 | 101-84-8 | Éter difenílico | 4,2 | |
| 54 | 85-01-8 | Fenantreno | 4,5 | |
| 55 | 104-51-8 | n-Butilbenceno | 4,6 | |
| 56 | 103-29-7 | Dibencilo | 4,8 | |
| 57 | 3558-69-8 | 2,6-Difenilpiridina | 4,9 | |
| 58 | 206-44-0 | Fluoranteno | 5,1 | |
| 59 | 603-34-9 | Trifenilamina | 5,7 | |
| 60 | 50-29-3 | DDT | 6,5 | |

▼M6

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Estimación previa del coeficiente de reparto**

16. Si es necesario, puede estimarse el coeficiente de reparto de la sustancia problema, preferentemente mediante un método de cálculo (véase el apéndice), o bien, cuando sea adecuado, utilizando la relación de las solubilidades de la sustancia problema en los disolventes puros.

*Equipo*

17. Se debe disponer de un cromatógrafo de líquidos provisto de una bomba de baja pulsación y un sistema adecuado de detección. Un detector de UV, con una longitud de onda de 210 nm, o un detector de índice de refracción, es aplicable a una amplia variedad de grupos químicos. La presencia de grupos polares en la fase estacionaria puede afectar gravemente al funcionamiento de la columna de HPLC; por tanto, las fases estacionarias deben presentar la mínima proporción posible de grupos polares (16). Pueden utilizarse rellenos de fase inversa con micropartículas o columnas ya rellenas, disponibles comercialmente. Puede ponerse una precolumna entre el sistema de inyección y la columna de análisis.

*Fase móvil*

18. Para preparar el disolvente de elución, se utilizan metanol de grado HPLC y agua destilada o desionizada; el disolvente se desgasifica antes de utilizarse. Se debe utilizar una elución isocrática. Deben utilizarse mezclas de metanol/agua con un contenido mínimo de agua del 25 %. La mezcla típica de metanol-agua en la proporción de 3:1 (v/v) es satisfactoria para eluir sustancias de log P igual a 6 en el plazo de una hora, con un caudal de 1 ml/min. En el caso de sustancias de log P mayor de 6, puede ser necesario abreviar su tiempo de elución (y el de las sustancias de referencia) disminuyendo la polaridad de la fase móvil o la longitud de la columna.

19. La sustancia problema y las sustancias de referencia deben ser solubles en la fase móvil en concentración suficiente para permitir su detección. Se podrán utilizar aditivos con la mezcla metanol-agua solo en casos excepcionales, ya que cambian las propiedades de la columna. En estos casos, debe comprobarse que los tiempos de retención de las sustancias problema y de referencia no se ven afectados. Si la mezcla metanol-agua no es adecuada, pueden utilizarse mezclas de agua con otros disolventes orgánicos, como etanol, acetonitrilo, o 2-propanol (alcohol isopropílico).

20. El pH del eluyente es fundamental para las sustancias ionizables. Debe situarse en el intervalo de pH de funcionamiento de la columna, que suele estar entre 2 y 8. Se recomienda el uso de soluciones amortiguadoras. Hay que evitar la precipitación de sales y el deterioro de la columna que se producen con algunas mezclas de fase orgánica con soluciones amortiguadoras. Las medidas de HPLC con fases estacionarias a base de sílice con pH superior a 8 no suelen ser recomendables porque el uso de una fase móvil alcalina puede provocar una rápida alteración de las características de la columna.

*Solutos*

21. Las sustancias problema y de referencia deben ser suficientemente puras a fin de asignar los picos de los cromatogramas a las sustancias respectivas. Si es posible, las sustancias que se vayan a utilizar en el ensayo o en la calibración se disolverán en la fase móvil. Si se utiliza un disolvente distinto de la fase móvil para disolver las sustancias problema y de referencia, la fase móvil debe utilizarse para la dilución final antes de la inyección.

*Condiciones de ensayo*

22. La temperatura durante las medidas no debe variar más de ± 1 °C.

▼M6

**Determinación del tiempo muerto $t_0$**

23. El tiempo muerto $t_0$ puede medirse utilizando sustancias orgánicas que no se retienen (p. ej., tiourea o formamida). Puede obtenerse el tiempo muerto con más precisión a partir de los tiempos de retención medidos del conjunto de unos siete miembros de una serie homóloga (por ejemplo, n-alquil-metil-cetonas) (17). Se representan los tiempos de retención $t_R$ ($n_C$+ 1) frente a $t_R$ ($n_C$), donde $n_C$ es el número de átomos de carbono. Se obtiene una línea recta, $t_R$ ($n_C$ + 1) = A $t_R$ ($n_C$) + (1 – A)$t_0$, donde A, que representa a $k(n_C + 1)/k(n_C)$, es una constante. El tiempo muerto $t_0$ se obtiene a partir de la ordenada en el origen (1 – A)$t_0$ y de la pendiente A.

**Ecuación de regresión**

24. El siguiente paso es representar la correlación entre log k y log P de sustancias de referencia adecuadas, con valores de log P cercanos al valor previsto de la sustancia problema. En la práctica, se inyectan simultáneamente de 6 a 10 sustancias de referencia. Se determinan los tiempos de retención, de preferencia con un integrador-registrador unido al sistema de detección. Se representan en función de log P los correspondientes logaritmos de los factores de capacidad, log k. La ecuación de regresión se realiza a intervalos regulares, al menos una vez al día, de forma que puedan tenerse en cuenta los posibles cambios de las características de la columna.

DETERMINACIÓN DEL $P_{OW}$ DE LA SUSTANCIA PROBLEMA

25. Se inyectan las cantidades más pequeñas detectables de la sustancia problema. Se determina por duplicado el tiempo de retención. El coeficiente de reparto de la sustancia problema se obtiene por interpolación del factor de capacidad calculado en la curva de calibración. En caso de coeficientes de reparto muy bajos y muy altos, es necesario hacer una extrapolación. Especialmente en estos casos debe prestarse atención a los límites de confianza de la línea de regresión. Si el tiempo de retención de la muestra se sitúa fuera de la gama de tiempos de retención obtenidos con los patrones, tiene que darse un valor límite.

DATOS E INFORME

**Informe del ensayo**

26. Los siguientes elementos deberán incluirse en el informe:

— si se ha efectuado una estimación previa del coeficiente de reparto, los valores estimados y el método utilizado; y, si se ha utilizado un método de cálculo, su descripción completa, incluida la identificación de la base de datos e información detallada sobre la selección de los fragmentos;

— sustancias problema y de referencia: pureza, fórmula estructural y número CAS;

— descripción del equipo y de las condiciones de funcionamiento: columna de análisis, precolumna;

— fase móvil, medio de detección, intervalo de temperatura, pH;

— perfiles de elución (cromatogramas);

— tiempo muerto y método para medirlo;

— datos de la retención y valores de log $P_{ow}$ de la bibliografía correspondientes a las sustancias de referencia utilizadas en la calibración;

— datos de la recta de regresión ajustada (log k frente a log $P_{ow}$) y coeficiente de correlación de la recta, incluidos los intervalos de confianza;

▼**M6**

— datos de retención media y valor interpolado de log $P_{ow}$ de la sustancia problema;

— en el caso de una mezcla: cromatograma del perfil de elución con indicación de los valores de corte;

— valores de log $P_{ow}$ en relación con el porcentaje del área del pico de log $P_{ow}$;

— cálculo utilizando una recta de regresión;

— media ponderada calculada de los valores de log $P_{ow}$, cuando corresponda.

BIBLIOGRAFÍA

(1) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. Chemosphere. 12, 1459.

(2) W. Klein, W. Kördel, M. Weiss and H.J. Poremski. (1988). Updating of the OECD Test Guideline 107 Partition Coefficient n-Octanol-Water, OECD Laboratory Intercomparison Test on the HPLC Method. Chemosphere. 17, 361.

(3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. Pesticide Science. 17, 311.

(4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. Pesticide. Science. 12, 219.

(5) B. McDuffie (1981). Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. Chemosphere. 10, 73.

(6) OCDE (2000). Guideline for Testing of Chemicals — Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline, Noviembre de 2000.

(7) OSPAR (1995). «Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995», Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20–24 de febrero de 1995.

(8) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An User Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3 de agosto.

(9) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges. Environmental Modelling & Software Vol. 13, pp. 529-537.

(10) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980). Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. Chemosphere. 9, 683.

(11) W.E. Hammers, G.J. Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. J. Chromatography 247, 1.

(12) J.E. Haky and A.M. Young. (1984). Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. J. Liq. Chromatography. 7, 675.

(13) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. Journal of Biomedical Materials Research. 15, 787.

▼**M6**

(14) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. Wiley, Nueva York.

(15) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity — Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.

(16) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther. 14, 479.

(17) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony and J. Inczédy. (1980). On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. J. Liq. Chromato. 3, 1669.

▼**M6**

*Apéndice*

**Métodos de cálculo del $P_{OW}$**

INTRODUCCIÓN

1. El presente apéndice proporciona una breve introducción al cálculo del $P_{ow}$. Para más información, se remite al lector a los libros de texto (1) (2).

2. Los valores calculados de $P_{ow}$ se utilizan para:

— decidir qué método experimental se debe utilizar: método de frasco de agitación para log $P_{ow}$ entre – 2 y 4, y método de HPLC para log $P_{ow}$ entre 0 y 6;

— seleccionar las condiciones que deben utilizarse en la HPLC (sustancias de referencia, proporción metanol/agua);

— controlar la verosimilitud de los valores obtenidos mediante métodos experimentales;

— proporcionar una estimación cuando no puedan aplicarse los métodos experimentales.

**Principio de los métodos de cálculo**

3. Los métodos de cálculo aquí sugeridos se basan en la fragmentación teórica de la molécula en subestructuras adecuadas de las que se conocen incrementos fiables de log $P_{ow}$. El log $P_{ow}$ se obtiene sumando los valores de los fragmentos y los términos de corrección por las interacciones intramoleculares. Existen listas de constantes de fragmentos y términos de corrección (1) (2) (3) (4) (5) (6). Algunas se actualizan periódicamente (3).

**Fiabilidad de los valores calculados**

4. En general, la fiabilidad de los métodos de cálculo disminuye según aumenta la complejidad de la sustancia estudiada. En el caso de las moléculas simples de bajo peso molecular y uno o dos grupos funcionales, puede esperarse una desviación de 0,1 a 0,3 unidades de log $P_{ow}$ entre los resultados de los diferentes métodos de fragmentación y los valores medidos. El margen de error dependerá de la fiabilidad de las constantes de fragmentos utilizadas, de la capacidad de reconocer interacciones intramoleculares (p. ej., enlaces de hidrógeno) y del uso adecuado de los términos de corrección. En el caso de sustancias que se ionizan, han de tenerse en cuenta la carga y el grado de ionización (10).

**Método de π de Fujita-Hansch**

5. La constante de hidrofobicidad del sustituyente, π, introducida originalmente por Fujita *et al.* (7) se define de la manera siguiente:

$$^{\pi}X = \log P_{ow}\ (PhX) - \log P_{ow}\ (PhH)$$

donde PhX es un derivado aromático y PhH es la sustancia original,

$$\text{p. ej.,}\quad ^{\pi}Cl = \log P_{ow}\ (C_6H_5Cl) - \log P_{ow}\ (C_6H_6)$$
$$= 2{,}84 - 2{,}13$$
$$= 0{,}71$$

El método de π es interesante sobre todo para sustancias aromáticas. Se dispone de los valores de π de un gran número de sustituyentes (4) (5).

**Método de Rekker**

6. Con el método de Rekker (8), el valor de log $P_{ow}$ se calcula de la forma siguiente:

$$Log\ P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{términos de interacción})$$

▼M6

donde $a_i$ es el número de veces que un fragmento dado aparece en la molécula y $f_i$ es el incremento de log $P_{ow}$ del fragmento. Los términos de interacción pueden expresarse como integral múltiple de una sola constante $C_m$ (llamada «constante mágica»). Las constantes de fragmento $f_i$ y $C_m$ se han obtenido a partir de una lista de 1 054 valores experimentales de $P_{ow}$ de 825 sustancias mediante análisis de regresión múltiple (6) (8). La determinación de los términos de interacción se lleva a cabo según normas establecidas (6) (8) (9).

**Método de Hansch-Leo**

7. Con el método de Hansch y Leo (4), el valor de log $P_{ow}$ se calcula de la forma siguiente:

$$\text{Log } P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j$$

donde $f_i$ es una constante de fragmento, $F_j$ es un término de corrección (factor), y $a_i$ y $b_j$ son la frecuencia correspondiente de presencia. Las listas de valores de fragmentos (de átomos y de grupos) y de términos de corrección $F_j$ se obtuvieron por tanteo a partir de valores experimentales de $P_{ow}$. Los términos de corrección se han dividido en varias clases diferentes (1) (4). Se han desarrollado paquetes de programas informáticos para tener en cuenta todas las normas y términos de corrección (3).

MÉTODO COMBINADO

8. El cálculo de log $P_{ow}$ de moléculas complejas puede mejorarse considerablemente si se divide la molécula en grandes subestructuras de las que se conozcan valores fiables de log $P_{ow}$, bien a partir de listas (3) (4) o bien por mediciones previas. Estos fragmentos (p. ej., heterociclos, antraquinona, azobenceno) pueden combinarse con los valores $\pi$ de Hansch o con las constantes de fragmento de Rekker o Leo.

*Observaciones*

i) Los métodos de cálculo son aplicables a las sustancias parcial o completamente ionizadas solo cuando se tienen en cuenta los necesarios factores de corrección.

ii) Si puede suponerse la presencia de enlaces de hidrógeno intramoleculares, hay que añadir los correspondientes términos de corrección (aproximadamente, de + 0,6 a + 1,0 unidades de log $P_{ow}$) (1). Pueden obtenerse indicaciones sobre la presencia de tales enlaces a partir de modelos estéricos o datos espectroscópicos.

iii) Si son posibles varias formas tautoméricas, debe usarse como base para el cálculo la forma más probable.

iv) Hay que seguir cuidadosamente las revisiones de las listas de constantes de fragmento.

BIBLIOGRAFÍA SOBRE MÉTODOS DE CÁLCULO

(1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, Nueva York (1982).

(2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (Nueva York) y Oxford (1986).

(3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, EE.UU., Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).

(4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, Nueva York (1979).

▼**M6**

(5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses. *Chemical. Reviews.* 71, 525.

(6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. — Chim. Ther.* 14, 479.

(7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch (1964). A New Substituent Constant, π, Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175.

(8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, Nueva York (1977).

(9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. *Chemosphere.* 12, 1459.

(10) R.A. Scherrer. ACS — Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

▼M7

## A.25. CONSTANTES DE DISOCIACIÓN EN AGUA (MÉTODO DE VALORACIÓN VOLUMÉTRICA — MÉTODO DE ESPECTROFOTOMETRÍA — MÉTODO DE CONDUCTIMETRÍA)

INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE 112 (1981).

**Condiciones previas**

— Método analítico adecuado

— Hidrosolubilidad

**Información orientativa**

— Fórmula estructural

— Conductividad eléctrica para el método de conductimetría

*Indicación general sobre el método de ensayo*

— Todos los métodos de ensayo pueden aplicarse a sustancias puras o de calidad comercial. Debe considerarse el posible efecto de las impurezas sobre los resultados.

— El método de valoración volumétrica no es adecuado para las sustancias poco solubles (véase la sección Soluciones de ensayo, más abajo).

— El método de espectrofotometría solo es aplicable a las sustancias cuyos espectros de absorción UV/VIS son sensiblemente diferentes para las formas disociadas y las no disociadas. Este método también puede ser adecuado para sustancias poco solubles y para disociaciones que no sean del tipo ácido/base como, por ejemplo, la formación de complejos.

— En los casos en que se cumple la ecuación de Onsager puede utilizarse el método de conductimetría, incluso a concentraciones moderadamente bajas e incluso en caso de equilibrios distintos de los del tipo ácido/base.

*Documentos de referencia*

El presente método de ensayo se basa en métodos que figuran en las referencias de la sección de «Bibliografía» y en el documento *Preliminary Draft Guidance for Premanufacture Notification* de la EPA, de 18 de agosto de 1978.

MÉTODO — INTRODUCCIÓN, OBJETIVO, ÁMBITO DE APLICACIÓN, PERTINENCIA, APLICACIÓN Y LÍMITES DEL ENSAYO

La disociación de una sustancia en el agua es importante para evaluar su impacto sobre el medio ambiente. De ella depende la forma de la sustancia, que a su vez determina su comportamiento y transporte. Puede afectar a la adsorción del producto en el suelo y los sedimentos y a su absorción en células biológicas.

**Definiciones y unidades**

La disociación es la descomposición reversible en dos o más especies químicas que pueden ser iónicas. El proceso se representa generalmente mediante la ecuación:

$$RX \rightleftharpoons R^{+} + X^{-}$$

y la constante de equilibrio de concentraciones que gobierna la reacción es

$$K = \frac{[R^{+}][X^{-}]}{[RX]}$$

Por ejemplo, en el caso particular en que R es el hidrógeno (la sustancia es un ácido), la constante es

▼M7

$$K_\alpha = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]}$$

o bien

$$pK_\alpha = pH - \log\frac{[X^-]}{[HX]}$$

**Sustancias de referencia**

No es preciso emplear las sustancias de referencia siguientes cada vez que se estudia una nueva sustancia. Se facilitan principalmente para poder efectuar de vez en cuando el calibrado del método y ofrecer la posibilidad de comparar los resultados cuando se aplique un método distinto.

| | $pK_a$ ([1]) | Temp. en °C |
|---|---|---|
| p-Nitrofenol | 7,15 | 25 ([1]) |
| Ácido benzoico | 4,12 | 20 |
| p-Cloroanilina | 3,93 | 20 |

([1]) No se dispone de ningún valor a 20 °C, pero puede aceptarse que la variabilidad de los resultados de la medición es superior a la dependencia de la temperatura que cabe esperar.

Sería útil disponer de una sustancia con varios pK como se indica en la sección Principio del método, más abajo. Esta sustancia podría ser la siguiente:

| Ácido cítrico | $pK_a$ (8) | Temp. en °C |
|---|---|---|
| | 1) 3,14 | 20 |
| | 2) 4,77 | 20 |
| | 3) 6,39 | 20 |

**Principio del método**

El proceso químico descrito suele depender solo ligeramente de la temperatura, en el intervalo de temperaturas pertinentes para el medio ambiente. La determinación de la constante de disociación requiere una medición de las concentraciones de las formas disociadas y sin disociar de la sustancia. La constante adecuada puede determinarse a partir de la estequiometría de la reacción de disociación indicada en la sección Definiciones y unidades, más arriba. En el caso concreto descrito en el presente método de ensayo, la sustancia se comporta como ácido o base, y la determinación más conveniente se hace midiendo las concentraciones relativas de las formas ionizadas y sin ionizar de la sustancia y el pH de la solución. La relación entre estos términos se da en la ecuación del $pK_a$ en la sección Definiciones y unidades, más arriba. Algunas sustancias presentan más de una constante de disociación y pueden obtenerse ecuaciones similares. Algunos de los métodos descritos aquí son también adecuados para disociaciones distintas del tipo ácido/base.

**Criterios de calidad**

*Repetibilidad*

La constante de disociación debe repetirse (un mínimo de tres determinaciones) con una variación no superior a ± 0,1 unidades logarítmicas.

DESCRIPCIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO

Hay dos planteamientos básicos para la determinación del $pK_a$. Uno supone la valoración volumétrica de una cantidad conocida de sustancia con ácido o base patrón, según proceda; el otro consiste en determinar la concentración relativa de las formas ionizadas y sin ionizar y su dependencia del pH.

▼M7

**Preparación**

Los métodos basados en estos principios pueden clasificarse como procedimientos de valoración volumétrica, de espectrofotometría y de conductimetría.

*Soluciones de ensayo*

Para los métodos de valoración volumétrica y de conductimetría, el producto debe disolverse en agua destilada. Para los métodos de espectrofotometría y otros tipos se utilizan soluciones amortiguadoras. La concentración de la sustancia problema no debe ser superior a 0,01 M o a la mitad de la concentración de saturación (si este valor es menor), y para preparar las soluciones debe emplearse la forma más pura posible de la sustancia. Si la sustancia es poco soluble, podrá disolverse en una pequeña cantidad de un solvente miscible con agua, antes de añadirla hasta conseguir las concentraciones indicadas anteriormente.

Las soluciones deben verificarse utilizando el efecto Tyndall con objeto de detectar la presencia de emulsiones, especialmente si se ha utilizado un cosolvente para aumentar la solubilidad. Si se utilizan soluciones amortiguadoras, la concentración de esta no debe ser superior a 0,05 M.

**Condiciones del ensayo**

*Temperatura*

La temperatura debe controlarse con una precisión mínima de ± 1 °C. La determinación debe efectuarse preferentemente a 20 °C.

Si se sospecha que el resultado depende significativamente de la temperatura, la determinación debe realizarse al menos a otras dos temperaturas. Los intervalos de temperatura deben ser en este caso de 10 °C y el control de la temperatura de ± 0,1 °C.

*Análisis*

El método se determinará en función de la naturaleza de la sustancia problema. Debe ser lo suficientemente sensible para permitir la determinación de las distintas especies a la concentración de cada solución de ensayo.

**Realización del ensayo**

*Método de valoración volumétrica*

La solución de ensayo se determina por valoración volumétrica con la solución patrón de ácido o de base, según proceda, y midiendo el pH después de cada adición de valorante. Deben efectuarse al menos diez adiciones graduales antes de llegar al punto de equivalencia. Si se alcanza el equilibrio con suficiente rapidez, puede utilizarse un potenciómetro gráfico. A efectos del presente método, es preciso conocer con exactitud tanto la cantidad total de sustancia como su concentración. Deben tomarse las precauciones necesarias para excluir la presencia de dióxido de carbono. En los ensayos normalizados se encuentran pormenores del procedimiento, precauciones y cálculos, por ejemplo en las referencias (1), (2), (3), (4).

*Método de espectrofotometría*

Se encuentra una longitud de onda a la que las formas ionizada y sin ionizar de la sustancia tienen coeficientes de extinción sensiblemente diferentes. Se obtiene el espectro de absorción UV/VIS de soluciones de concentración constante a un pH al que la sustancia está esencialmente sin ionizar, a un pH al que está totalmente ionizada, y a varios pH intermedios. Esto puede llevarse a cabo bien añadiendo incrementos de ácido concentrado (o base) a un volumen relativamente grande de una solución de la sustancia de carácter amortiguador y de varios componentes, al principio a pH elevado (o bajo) (ref. 5), o bien añadiendo volúmenes iguales de una solución madre de la sustancia en, por ejemplo, agua o metanol, a volúmenes constantes de diversas soluciones amortiguadoras que abarquen el intervalo deseado de pH. Los valores del pH y de absorbancia a la longitud de onda elegida permiten calcular un número suficiente de valores de $pK_a$, utilizando datos de al menos 5 valores de pH a los que la sustancia esté ionizada como mínimo en un 10 % y sin llegar al 90 %. En la referencia (1) se dan más detalles experimentales y el método de cálculo.

▼M7

*Método de conductimetría*

En una celda de constante pequeña y conocida, se mide la conductividad de una solución aproximadamente 0,1 M de la sustancia en agua de conductividad. Se mide también la conductividad de una serie de diluciones de esta solución efectuadas con exactitud. La concentración se reduce a la mitad cada vez, y la serie debe abarcar al menos un orden de magnitud de concentración. La conductividad limitante a dilución infinita se encuentra realizando un experimento similar con la sal sódica y extrapolando. El grado de disociación puede calcularse entonces a partir de la conductividad de cada solución mediante la ecuación de Onsager, y a continuación, haciendo uso de la ley de dilución de Ostwald, puede calcularse la constante de disociación como $K = \alpha^2 C/(1 - \alpha)$, donde C es la concentración en moles por litro y α es la fracción disociada. Deben tomarse las precauciones necesarias para excluir la presencia de $CO_2$. En los textos de las normas y en las referencias (1), (6) y (7) se dan más detalles experimentales y el método de cálculo.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

*Método de valoración volumétrica*

Se calcula el valor del $pK_a$ en 10 puntos de medición de la curva de valoración. Se calculan la media y la desviación típica de estos valores de $pK_a$. Debe incluirse una representación gráfica del pH frente al volumen de base o ácido patrón, junto con una presentación en forma de cuadro.

*Método de espectrofotometría*

Se presentan en forma de cuadro la absorbancia y el pH de cada espectro. Se calculan al menos cinco valores de $pK_a$ a partir de los puntos de datos de espectros intermedios, y también se calculan la media y la desviación típica de estos resultados.

*Método de conductimetría*

Se calcula la conductividad equivalente Λ para cada concentración de ácido y para cada concentración de una mezcla de un equivalente de ácido más 0,98 equivalentes de hidróxido de sodio exento de carbonato. El ácido se encuentra en exceso para evitar un exceso de $OH^-$ debido a la hidrólisis. Se representa $1/\Lambda$ frente a Ö_C y puede determinarse la $\Lambda_o$ de la sal por extrapolación a concentración cero.

La $\Lambda_o$ del ácido puede calcularse utilizando los valores de la bibliografía para $H^+$ y $Na^+$. El $pK_a$ puede calcularse de $\alpha = \Lambda_i / \Lambda_o$ y $K_a = \alpha^2 C/(1 - \alpha)$ para cada concentración. Es posible obtener mejores valores de $K_a$ aplicando correcciones para tener en cuenta la movilidad y la actividad. Deben calcularse la media y la desviación típica de los valores de $pK_a$.

**Informe del ensayo**

Deben presentarse todos los datos en bruto y los valores calculados de $pK_a$, junto con el método de cálculo (de preferencia en forma de cuadro, tal como se sugiere en la referencia 1), así como los parámetros estadísticos descritos anteriormente. En el caso de los métodos de valoración volumétrica, deben darse datos de la normalización de los valorantes.

En el caso del método de espectrofotometría, deben presentarse todos los espectros. En el caso del método de conductimetría, deben darse datos de la determinación de la constante de celda. Debe aportarse información sobre la técnica utilizada, los métodos analíticos y la naturaleza de los eventuales amortiguadores utilizados.

Debe indicarse la temperatura o temperaturas de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases,* Wiley, Inc., New York, 1962.

▼**M7**

(2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, Env. Sci. Tech. 3, II, pp. 1186-1188 (1969).

(3) ASTM D 1293 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.

(5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. Chem. Ind. (London) 281, (March 1973).

(6) ASTM D 1125 — Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.

(7) Standard Method 205 — APHA/AWWA/NPCF (see above (4)).

(8) *Handbook of Chemistry and Physics,* 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).

▼B

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

ÍNDICE


INTRODUCCIÓN GENERAL DE LA PARTE B

B.1 bis. TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE DOSIS FIJAS

B.1 ter. TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA

B.2. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN

B.3. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA CUTÁNEA

B.4. TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA

B.5. IRRITACIÓN/CORROSIÓN OCULAR AGUDA

B.6. SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL

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

B.8. TOXICIDAD SUBAGUDA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 28 DÍAS

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

B.10. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN MAMÍFEROS *IN VITRO*

B.11. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFERO

B.12. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE MAMÍFERO

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

B.17. ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO* UTILIZANDO LOS GENES HPRT Y XPRT

B.21. ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

B.22. ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES

▼B

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

B.25. TRANSLOCACIÓN HEREDITARIA EN EL RATÓN

B.26. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA — TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN ROEDORES

B.27. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA — TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN NO ROEDORES

B.28. TOXICIDAD DÉRMICA SUBCRÓNICA — ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES

B.29. TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 90 DÍAS

B.30. ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA

B.31. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA EL DESARROLLO PRENATAL

B.32. ENSAYO DE CARCINOGÉNESIS

B.33. ENSAYO COMBINADO DE TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGÉNESIS

B.34. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN

B.35. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN EN DOS GENERACIONES

B.36. TOXICOCINÉTICA

B.37. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRACIÓN ÚNICA

B.38. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS. ESTUDIO POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA DE 28 DÍAS

B.39. ENSAYO DE SÍNTESIS DE ADN NO PROGRAMADA (UDS) EN HEPATOCITOS DE MAMÍFERO *IN VIVO*

B.40. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO DE RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSCUTÁNEA (RET)

B.40 BIS. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO CON EPIDERMIS HUMANA RECONSTRUIDA (EHR)

B.41. ENSAYO DE FOTOTOXICIDAD *IN VITRO* 3T3 ARN (ABSORCIÓN DE ROJO NEUTRO)

B.42. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES

▼B

B.43. ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD EN ROEDORES

B.44. ABSORCIÓN CUTÁNEA: MÉTODO *IN VIVO*

B.45. ABSORCIÓN CUTÁNEA: MÉTODO *IN VITRO*

B.46. IRRITACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO CON EPIDERMIS HUMANA RECONSTRUIDA

B.47. MÉTODO DE ENSAYO DE LA OPACIDAD Y PERMEABILIDAD DE LA CÓRNEA DE BOVINO PARA IDENTIFICAR: I) PRODUCTOS QUE PROVOCAN LESIONES OCULARES GRAVES Y II) PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN POR IRRITACIÓN OCULAR NI LESIONES OCULARES GRAVES

B.48. MÉTODO DE ENSAYO DE OJO DE POLLO AISLADO PARA IDENTIFICAR: I) PRODUCTOS QUE PROVOCAN LESIONES OCULARES GRAVES Y II) PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN POR IRRITACIÓN OCULAR NI LESIONES OCULARES GRAVES

B.49. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

B.50. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: DA

B.51. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: BrdU-ELISA

B.52. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA

B.53. ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD PARA EL DESARROLLO

B.54. BIOENSAYO UTEROTRÓFICO CON ROEDORES: ENSAYO DE CRIBADO A CORTO PLAZO DE LAS PROPIEDADES ESTROGÉNICAS

B.55. BIOENSAYO DE HERSHBERGER CON RATAS: ENSAYO DE CRIBADO A CORTO PLAZO DE LAS PROPIEDADES (ANTI)ANDROGÉNICAS

B.56. ESTUDIO AMPLIADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN

B.57. ENSAYO DE ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS H295R

B.58. ENSAYOS DE MUTACIÓN GÉNICA EN CÉLULAS SOMÁTICAS Y REPRODUCTORAS DE ROEDORES TRANSGÉNICOS

B.59. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN CHEMICO*: ENSAYO DIRECTO DE REACTIVIDAD PEPTÍDICA (DPRA)

B.60. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO DE LA LUCIFERASA ARE-NRF2

B.61. MÉTODO DE ENSAYO DE PÉRDIDA DE FLUORESCEÍNA PARA DETECTAR AGENTES CORROSIVOS E IRRITANTES INTENSOS PARA LOS OJOS

B.62. ENSAYO DEL COMETA EN CONDICIONES ALCALINAS CON MAMÍFEROS *IN VIVO*

▼B

B.63. ENSAYO DE CRIBADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

B.64. ESTUDIO DE TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA COMBINADO CON EL ENSAYO DE CRIBADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

B.65. MÉTODO DE ENSAYO *IN VITRO* CON BARRERA DE MEMBRANA PARA EVALUAR LA CORROSIÓN CUTÁNEA

B.66. ENSAYOS *IN VITRO* DE TRANSACTIVACIÓN TRANSFECTADA ESTABLEMENTE PARA DETECTAR AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS

B.67. ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO* UTILIZANDO EL GEN DE LA TIMIDINA-CINASA

B.68. MÉTODO DE ENSAYO IN VITRO CON EXPOSICIÓN DE BREVE DURACIÓN PARA DETECTAR: I) PRODUCTOS QUE PROVOCAN LESIONES OCULARES GRAVES Y II) PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN POR IRRITACIÓN OCULAR O LESIONES OCULARES GRAVES

B.69. MÉTODO DE ENSAYO CON EPITELIO HUMANO RECONSTRUIDO SIMILAR A LA CÓRNEA (EHRSC) PARA IDENTIFICAR PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO POR IRRITACIÓN OCULAR O LESIONES OCULARES GRAVES

B.70. ENSAYOS *IN VITRO* CON RECEPTOR ESTROGÉNICO RECOMBINANTE HUMANO (hrER) PARA DETECTAR PRODUCTOS CON AFINIDAD PARA UNIRSE A LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS

B.71. ESTUDIOS DE SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO* RELATIVOS AL FENÓMENO CLAVE DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA RUTA DE RESULTADOS ADVERSOS (AOP) DE LA SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA

▼B

INTRODUCCIÓN GENERAL DE LA PARTE B

A. **CARACTERIZACIÓN DE LA SUSTANCIA DE ENSAYO**

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

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

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

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

B. **CUIDADOS DE LOS ANIMALES**

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

i) *Condiciones de alojamiento*

Las condiciones ambientales de los ¡ocales o recintos destinados a los animales de experimentación deben ser adecuadas para la especie que se utilice. Para ratas, ratones y cobayas, la temperatura del local debe ser de 22 ± 3 $^{o}$C, con una humedad relativa del 30 al 70 %; para los conejos, la temperatura debe ser de 20 ± 3 $^{o}$C, con una humedad relativa del 30 al 70 %.

Algunas técnicas experimentales son particularmente sensibles a ¡os efectos de la temperatura; en tales casos, en la descripción del método de ensayo se incluyen indicaciones detalladas sobre las condiciones apropiadas. En todas las investigaciones sobre efectos tóxicos deben medirse y registrarse la temperatura y la humedad, y estos parámetros deben consignarse en el informe final del estudio.

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

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

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

▼B

ii) *Condiciones de alimentación*

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

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

C. **ENSAYOS ALTERNATIVOS**

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

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

D. **EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN**

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

E. **REFERENCIAS**

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

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

▼B

## B.1 *BIS.* TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE DOSIS FIJAS

### 1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 420 (2001).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Los métodos tradicionales para evaluar la toxicidad aguda utilizan la muerte de los animales como parámetro. En 1984 la British Toxicology Society propuso un nuevo enfoque de los ensayos de toxicidad aguda basado en la administración de una serie de dosis fijas (1) Este enfoque evitaba recurrir a la muerte de los animales como parámetro y se basaba, en cambio, en la observación de signos claros de toxicidad a un nivel determinado de una serie de dosis fijas. Tras una serie de estudios de validación *in vivo* británicos (2) e internacionales (3), este procedimiento fue adoptado como método de ensayo en 1992. Posteriormente, se han evaluado las propiedades estadísticas del método de dosis fijas utilizando modelos matemáticos en una serie de estudios (4) (5) (6). Conjuntamente, los estudios *in vivo y* los basados en modelos han demostrado que el procedimiento es reproducible, requiere menos animales y causa menos sufrimiento que los métodos tradicionales. Al mismo tiempo, permite clasificar las sustancias de manera parecida a los otros métodos de ensayo de toxicidad aguda.

En el *Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing* (7) se dan directrices sobre la selección del método de ensayo más adecuado en función del objetivo. Además, en este documento orientativo se facilita información complementaria sobre la realización e interpretación del método de ensayo B.1*bis*.

Es un principio del método que en el estudio principal solo se empleen dosis moderadamente tóxicas y que se evite la administración de dosis que se prevean letales. Asimismo, no es necesario administrar dosis de las que se sepa que producen dolor y sufrimiento acusados por sus efectos corrosivos o muy irritantes. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo serán sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En otro documento orientativo (8) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

El método aporta información sobre las propiedades peligrosas y permite clasificar las sustancias de acuerdo con el Sistema Armonizado Mundial (SAM) [Globally Harmonised System (GHS)] de clasificación de sustancias químicas que causan toxicidad aguda (9)

El laboratorio que haga los ensayos debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia estudiada antes de llevar a cabo la prueba. Tal información incluirá la identidad y la estructura química de la sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de otros ensayos de toxicidad *in vitro o in vivo,* los datos toxicológicos sobre otras sustancias estructuralmente relacionadas, y el uso o usos previstos de la sustancia. Esta información es necesaria para que todos los afectados puedan estar seguros de que el ensayo es pertinente para la protección de la salud humana y ayuda a la selección de una dosis inicial adecuada.

▼B

1.2. DEFINICIONES

**Toxicidad oral aguda:** efectos nocivos que se manifiestan tras la administración oral de una dosis única de la sustancia o de dosis múltiples dadas dentro de un período de 24 horas.

**Muerte retardada** significa que el animal no muere ni parece moribundo en el plazo de 48 horas sino que muere más tarde durante el período de observación de 14 días.

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo administrada. La dosis se expresa en peso de la sustancia de ensayo por unidad de peso del animal sometido al experimento (por ejemplo, mg/kg).

**Toxicidad manifiesta** es un término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de una sustancia [véanse ejemplos en (3)]. de tal manera que a la dosis fija inmediatamente superior pueden preverse en la mayoría de los animales dolores fuertes y signos continuados de sufrimiento grave, agonía [véanse los criterios al respecto en *Humane Endpoints Guidance Document* (8)] o muerte probable.

**SAM:** Sistema Armonizado Mundial [*Globally Harmonised System* (GHS)] de clasificación y etiquetado de productos químicos. Actividad conjunta de la OCDE (salud humana y medio ambiente), el Comité de Expertos en Transporte de Mercaderías Peligrosas de las Naciones Unidas (propiedades físico-químicas) y la OIT (comunicación de peligros), coordinada por el Programa Interorganismos para la Gestión Racional de Sustancias Químicas (IOMC, en sus siglas inglesas).

**Muerte inminente:** fase en la que se prevé que el animal muera o entre en la agonía antes del siguiente momento de observación previsto. Entre los signos que indican esta situación en los roedores cabe citar: convulsiones, posición lateral, posición yacente y temblores. [Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información].

DL50 **(dosis letal mediana):** dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia capaz de provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. El valor de la $DL_{50}$ se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (mg/kg).

**Dosis límite:** dosis del límite máximo del ensayo (2 000 o 5 000 mg/kg).

**Agonía:** situación en la que el animal se está muriendo o es incapaz de sobrevivir aunque reciba tratamiento. [Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información].

**Muerte previsible:** presencia de signos clínicos que indican la muerte en un momento conocido del futuro antes de la terminación prevista del experimento, por ejemplo: incapacidad de alcanzar alimentos o agua. [Véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (8) para más información].

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administran de manera gradual a grupos de animales de un solo sexo dosis fijas de 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg (excepcionalmente podría considerarse una dosis adicional de 5 000 mg/kg, véase el punto 1.6.2). La dosis inicial se determina basándose en un estudio preliminar y consiste en la que se prevé que produzca ciertos signos de toxicidad sin causar efectos tóxicos graves ni mortalidad. En un documento orientativo aparte de la OCDE (8) se describen de manera detallada las afecciones y los signos clínicos que denotan dolor, sufrimiento y muerte inminente. Pueden darse dosis más altas o más bajas a otros grupos de animales según la presencia o ausencia de signos de toxicidad o mortalidad. Este procedimiento continúa hasta que se determina la dosis que causa toxicidad manifiesta o solo una muerte o cuando no se observan efectos a la dosis más alta o cuando ocurren muertes a la dosis más baja.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Selección de la especie animal**

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Normalmente se emplean hembras (7). Se hace así porque la bibliografía sobre los ensayos convencionales de $DL_{50}$ muestra que normalmente hay poca diferencia en cuanto a sensibilidad entre los sexos, pero, en los casos en que se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles (10). Sin embargo, si se conocen propiedades toxicológicas o toxicocinéticas de sustancias químicas estructuralmente relacionadas que indiquen que es probable que los machos sean más sensibles, deberá utilizarse este sexo. Cuando el ensayo se haga con machos, deberá justificarse adecuadamente.

Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El animal, al inicio de la administración de la sustancia, debe tener entre 8 y 12 semanas de edad y su peso debe estar en un intervalo del ± 20 % del peso medio de los animales a los que previamente se haya administrado la sustancia.

1.4.2. **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplicará una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede darse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por dosis, pero el número de animales de cada jaula no debe obstaculizar la realización de observaciones claras de cada animal.

1.4.3 **Preparación de los animales**

Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar la administración de la sustancia, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

▼B

1.4.4 **Preparación de las dosis**

En general, las sustancias estudiadas deben administrarse en un volumen constante para toda la gama de dosis que deban ensayarse, variando la concentración del preparado administrado. Sin embargo, cuando deba administrarse una mezcla o producto final líquidos, puede resultar más adecuado para la posterior evaluación de riesgos utilizar la sustancia no diluida, es decir, a una concentración constante. Algunas autoridades reguladoras establecen este criterio con carácter obligatorio. En cualquiera de los dos casos, no debe superarse el volumen de dosis máximo. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. En los roedores, el volumen no debe sobrepasar 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de las soluciones acuosas, de las que se pueden usar 2 ml/100 g de peso corporal. En cuanto a la formulación del preparado que se administre, se recomienda el uso de una solución/suspensión/emulsión acuosa siempre que sea posible, seguida, en orden de preferencia, por una solución/suspensión/emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y luego posiblemente por la solución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Las dosis tienen que prepararse poco antes de la administración a menos que se conozca la estabilidad del preparado durante el período en que se vaya a utilizar y conste que esta sea aceptable.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 **Administración de las dosis**

La sustancia estudiada se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o cánula adecuada de intubación. Cuando se dé el caso, poco habitual, de que no pueda administrarse una dosis única, se podrá dividir esta en partes más pequeñas durante un período que no sobrepase las 24 horas.

Los animales se mantendrán en ayunas antes de la administración de la dosis (por ejemplo, las ratas no deberán recibir alimento alguno durante la noche, pero sí agua). Los ratones no deberán ser alimentados durante 3-4 horas, pero podrán beber agua). Tras el período de ayuno, los animales se pesarán antes de la administración de la sustancia estudiada. Una vez administrada esta, podrá continuarse el ayuno durante unas 3 o 4 horas en el caso de las ratas y 1 o 2 horas cuando se trate de ratones. Cuando una dosis se administre en fracciones a lo largo de un período, podrá ser necesario proporcionar a los animales alimento y agua, en función de la duración del período.

1.5.2 **Estudio preliminar**

La finalidad del estudio preliminar es determinar la dosis inicial adecuada para el estudio principal. La sustancia estudiada se administra a cada animal de manera secuencial según lo indicado en los gráficos del anexo 1. El estudio preliminar se considera terminado cuando puede tomarse una decisión sobre la dosis inicial para el estudio principal (o si se observa una muerte a la dosis fija más baja)

La dosis inicial para el estudio preliminar se selecciona a partir de los niveles de dosis fija de 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg y consiste en la dosis que se prevé que produzca toxicidad manifiesta, basándose, cuando sea posible, en datos obtenidos *in vivo* e *in vitro* referentes a la misma sustancia química y a otras sustancias estructuralmente relacionadas. A falta de esta información, la dosis inicial será de 300 mg/kg.

Se dejará transcurrir un plazo mínimo de 24 horas entre las administraciones de dosis a cada animal. El período de observación de todos los animales debe ser de, al menos, 14 días.

▼B

Excepcionalmente, y solo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otra dosis fija superior de 5 000 mg/kg (véase el anexo 3). Por razones de bienestar animal, se desaconseja el ensayo de sustancias de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial ($DL_{50}$ entre 2 000-5 000 mg/kg) con animales. Este ensayo solo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal o del medio ambiente.

En los casos en que se ensaye en un animal la dosis fija más baja (5 mg/kg) en un estudio preliminar y el animal muera, el procedimiento normal es poner fin al estudio y asignar la sustancia a la categoría 1 del SAM (tal como se indica en el anexo 1). Sin embargo, si se requiere confirmar la clasificación, puede seguirse un procedimiento opcional complementario, que se indica a continuación. Se administra a otro animal una dosis de 5 mg/kg. Si este muere, queda confirmada la categoría 1 del SAM y se pone fin al estudio inmediatamente. Si el segundo animal sobrevive, se administra una dosis de 5 mg/kg a otros tres animales. Dado que habrá un riesgo elevado de mortalidad, los animales recibirán la dosis de manera secuencial para proteger el bienestar animal. El intervalo entre la administración de la dosis a cada animal debe ser suficiente para que quede claro que el animal anterior tiene probabilidades de sobrevivir. Si ocurre una segunda muerte, se pondrá fin inmediatamene a la administración de dosis, y no se dará la sustancia a ningún otro animal. Dado que el hecho de que se produzca una segunda muerte (independientemente del número de animales sometidos a ensayo en el momento de la terminación) corresponde al resultado A (2 o más muertes), se seguirá la norma de clasificación del anexo 2 a la dosis fija 5 mg/kg (categoría 1 si hay dos o más muertes o categoría 2 si solo hay una muerte). Además, el anexo 4 da orientaciones sobre la clasificación en el sistema comunitario hasta que se aplique el nuevo SAM.

1.5.3 **Estudio principal**

1.5.3.1 *Número de animales y dosis*

La actuación que debe seguirse tras el ensayo al nivel de dosis inicial se indica en los gráficos del anexo 2. Deberá optarse por una de las tres actuaciones siguientes: terminar el ensayo y asignar a la sustancia la categoría de peligro adecuada, ensayar a una dosis fija superior o ensayar a una dosis fija inferior. Sin embargo, para proteger a los animales, no se repetirá en el estudio principal ningún nivel de dosis que haya causado un resultado de muerte en el estudio preliminar (véase el anexo 2). La experiencia ha mostrado que el resultado más probable al nivel de dosis inicial es que pueda clasificarse la sustancia y que no sean necesarios más ensayos.

Para cada nivel de dosis investigado se utilizará normalmente un total de cinco animales de un mismo sexo. Este grupo de cinco animales estará compuesto de un animal del estudio preliminar al que se haya administrado la sustancia al nivel de dosis seleccionado más otros cuatro (excepto cuando un nivel de dosis utilizado en el estudio principal no estuviera incluido en el estudio preliminar, situación que es poco frecuente).

El intervalo de tiempo entre la administración de dosis a cada nivel se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de animales con la dosis siguiente no se realizará hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados. Se recomienda, si es necesario, un período de tres o cuatro días entre la administración de cada nivel de dosis para poder observar la toxicidad retardada. Este intervalo puede ajustarse según convenga, por ejemplo en caso de respuestas no concluyentes.

▼B

Cuando se emplee una dosis fija superior de 5 000 mg/kg, se seguirá el procedimiento indicado en el anexo 3 (véase también el punto 1.6.2).

1.5.3.2 *Ensayo límite*

El ensayo límite se utiliza principalmente en situaciones en las que el experimentador tiene información de que la sustancia estudiada es probable que no sea tóxica, es decir, solo resulta tóxica por encima de las dosis límite reglamentarias. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos, mezclas o productos ensayados semejantes, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en la que se prevé que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.

Utilizando el procedimiento normal, una dosis inicial en el estudio preliminar de 2 000 mg/kg (o excepcionalmente 5 000 mg/kg) seguida por la administración de este nivel de dosis a cuatro animales sirve de ensayo límite para las presentes directrices.

1.6 OBSERVACIONES

Tras la administración de la dosis, se observan los animales uno por uno, al menos una vez durante los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas, prestando especial atención durante las primeras 4 horas, y a continuación diariamente, a lo largo de un total de 14 días, excepto cuando tengan que eliminarse del estudio y sacrificarse de manera compasiva por razones de bienestar animal o bien cuando resulten muertos. Sin embargo, no debe fijarse rígidamente la duración de la observación, sino que esta debe determinarse según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la longitud del período de recuperación, por lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos (11). Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en una ficha de cada animal.

Será necesario proceder a observaciones adicionales si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Entre las observaciones deben incluirse los cambios de la piel y del pelaje, ojos y membranas mucosas, y también de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso (central y autónomo), así como la actividad locomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el *Humane Endpoints Guidance Document* (8). Los animales moribundos y los que muestren dolor intenso o signos continuos de sufrimiento intenso deberán sacrificarse de forma compasiva. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

1.6.1 **Peso corporal**

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

▼B

1.6.2 **Patología**

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

2 **RESULTADOS**

Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, se reunirán todos los resultados en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la necropsia.

3 **INFORME**

3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Sustancia estudiada:

— naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización),

— identificación química, incluido el número CAS.

Vehículo (si procede):

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número, edad y sexo de los animales (incluida, cuando proceda, una justificación del uso de machos en vez de hembras),

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones de ensayo:

— información sobre la formulación de la sustancia de ensayo, incluida la forma física del material administrado,

— datos de la administración de la sustancia, incluidos el volumen y el momento de la administración,

— datos sobre la calidad del agua y los alimentos (incluido el origen/tipo de la dieta y el origen del agua),

— justificación de la elección de la dosis inicial.

▼B

Resultados:

— tabulación de las respuestas y los niveles de dosis de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluida la mortalidad, naturaleza, gravedad y duración de los efectos),

— tabulación del peso corporal y los cambios en el mismo,

— peso de cada animal el día en que se administre la dosis, posteriormente a intervalos semanales, y en el momento de la muerte o el sacrificio,

— fecha y hora de la muerte si es anterior al sacrificio previsto,

— cronología de la aparición de signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal,

— observaciones de la necropsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Evaluación e interpretación de los resultados.

Conclusiones.

4 **REFERENCIAS**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxico]., 3, 85-92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279-291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469-482 (3).

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313-324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol., 14, 315-323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure.-Hum. Exp. Toxicol., 21, 183 -196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

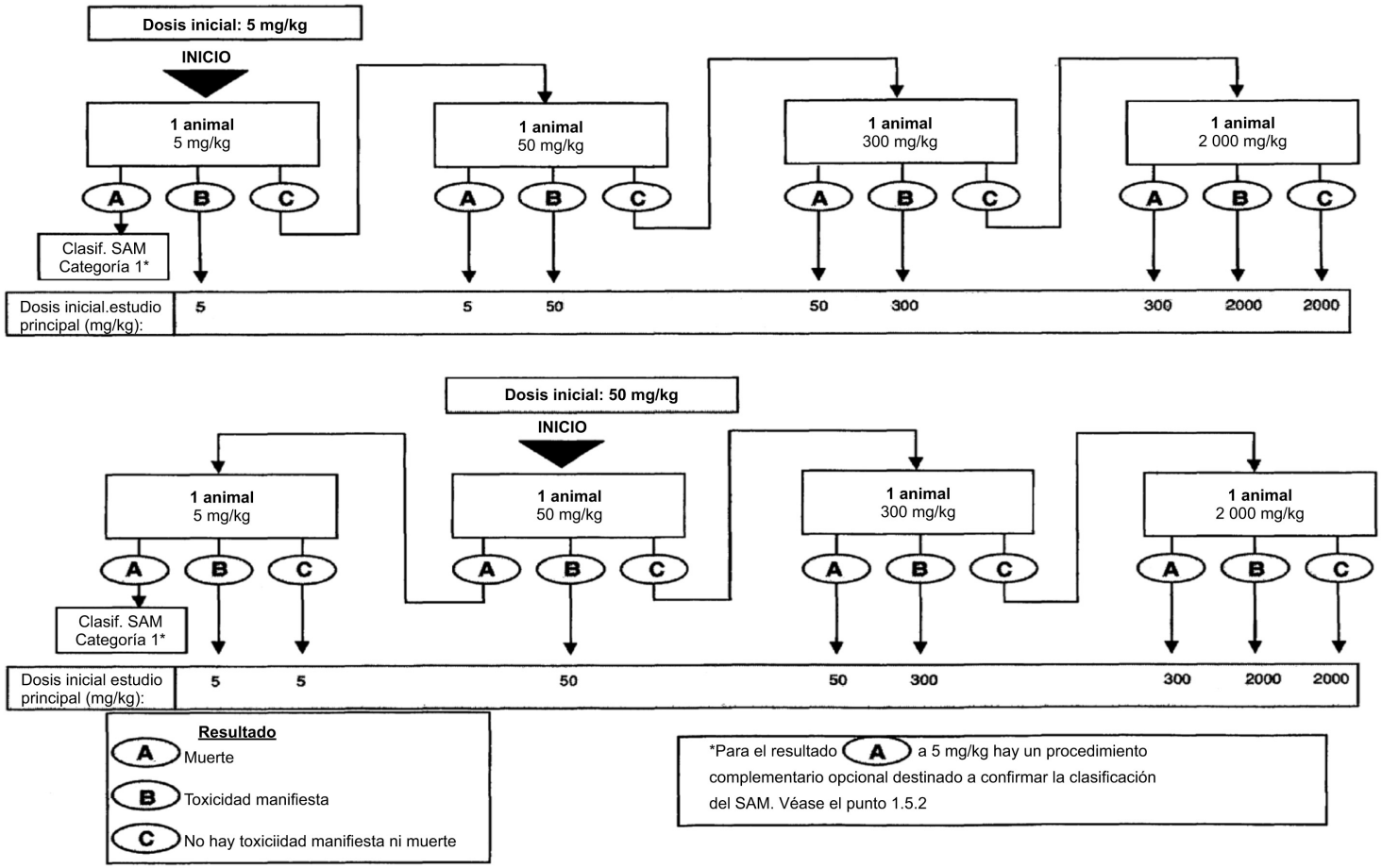
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygenera]/0,3380JEN- documents-521 -14-no-24-no-0,FF.htmI].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional $LD_{50}$, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223-231.

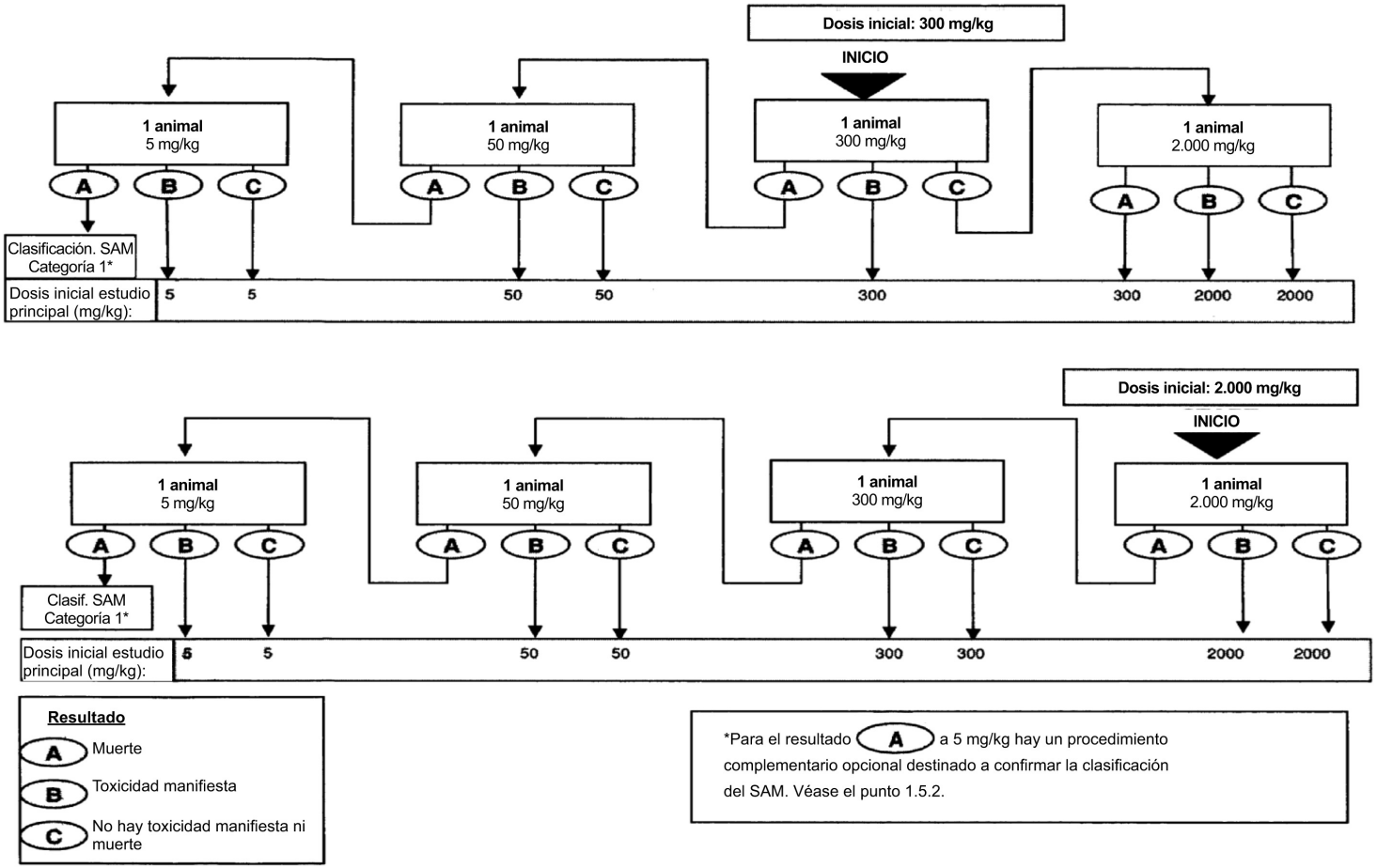
(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation, in: Principies and Methods of Toxicology. 3 rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA

*ANEXO 1*

**DIAGRAMA DEL ESTUDIO PRELIMINAR**

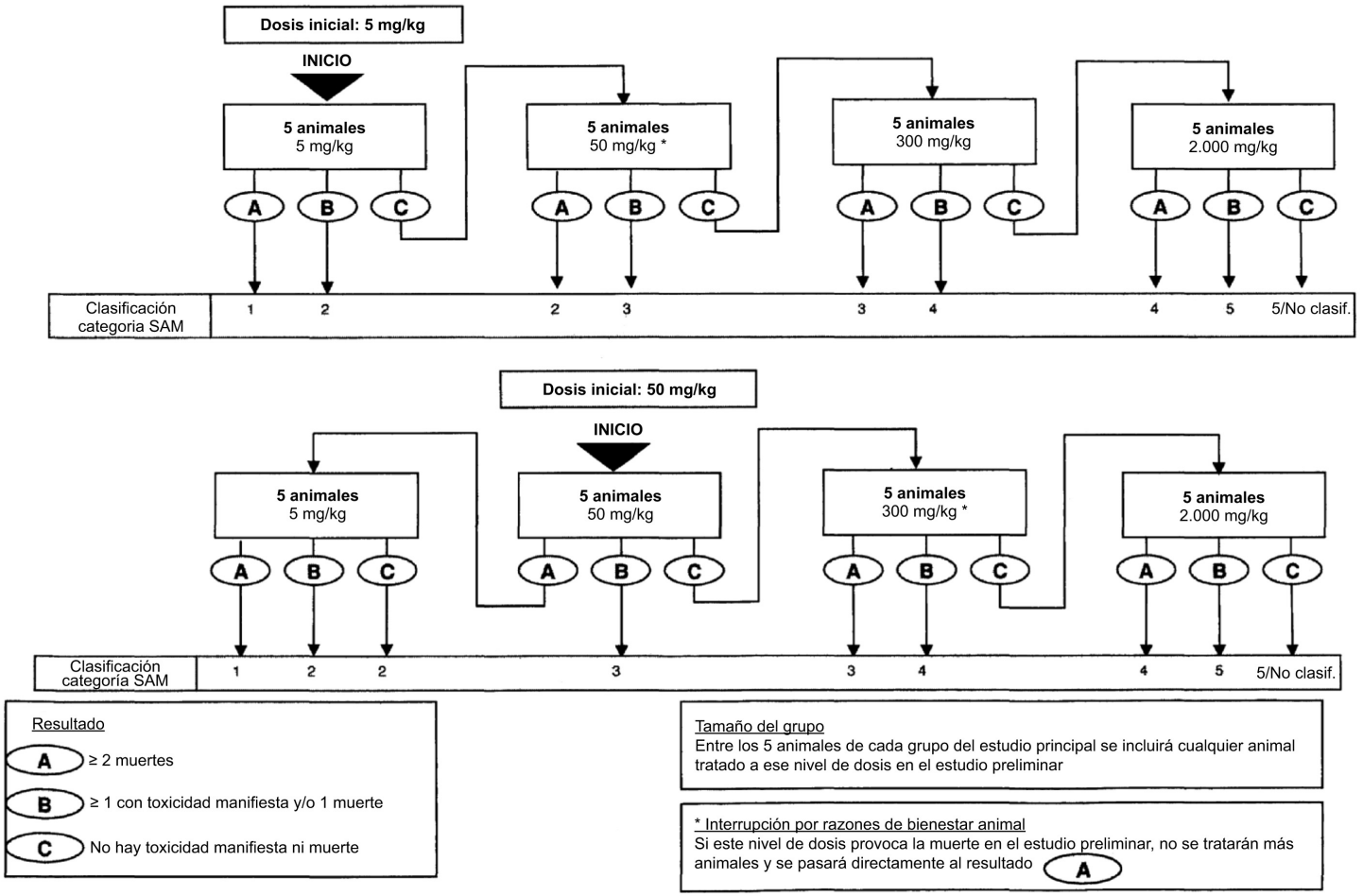


▼B

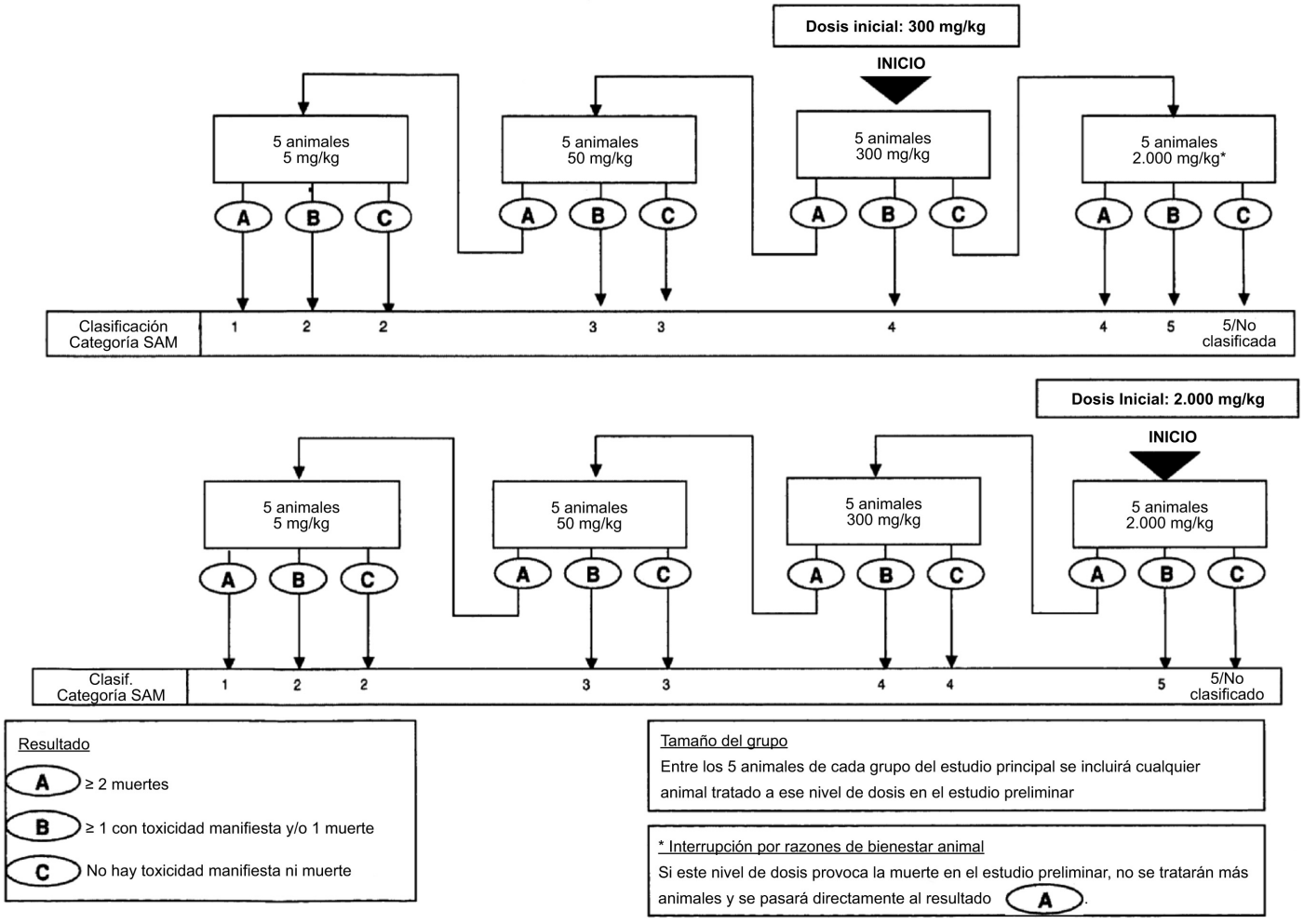

Dosis inicial: 300 mg/kg
INICIO
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2.000 mg/kg
A
B
C
Clasificación. SAM
Categoría 1*
Dosis inicial estudio
principal (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Dosis inicial: 2.000 mg/kg
INICIO
1 animal
5 mg/kg
1 animal
50 mg/kg
1 animal
300 mg/kg
1 animal
2.000 mg/kg
Clasif. SAM
Categoría 1*
Dosis inicial estudio
principal (mg/kg):
5
5
50
50
300
300
2000
2000
Resultado
A Muerte
B Toxicidad manifiesta
C No hay toxicidad manifiesta ni muerte
*Para el resultado A a 5 mg/kg hay un procedimiento complementario opcional destinado a confirmar la clasificación del SAM. Véase el punto 1.5.2.

*ANEXO 2*

**DIAGRAMA DEL ESTUDIO PRINCIPAL**



▼B


Dosis inicial: 300 mg/kg
INICIO
5 animales 5 mg/kg
5 animales 50 mg/kg
5 animales 300 mg/kg
5 animales 2.000 mg/kg*
A B C
Clasificación Categoría SAM
1 2 2 3 3 4 4 5 5/No clasificada
Dosis Inicial: 2.000 mg/kg
INICIO
5 animales 5 mg/kg
5 animales 50 mg/kg
5 animales 300 mg/kg
5 animales 2.000 mg/kg
Clasif. Categoría SAM
1 2 2 3 3 4 4 5 5/No clasificado
Resultado
A ≥ 2 muertes
B ≥ 1 con toxicidad manifiesta y/o 1 muerte
C No hay toxicidad manifiesta ni muerte
Tamaño del grupo
Entre los 5 animales de cada grupo del estudio principal se incluirá cualquier animal tratado a ese nivel de dosis en el estudio preliminar
* Interrupción por razones de bienestar animal
Si este nivel de dosis provoca la muerte en el estudio preliminar, no se tratarán más animales y se pasará directamente al resultado A.

▼B

*ANEXO 3*

**CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE SUSTANCIAS CON VALORES $DL_{50}$ PREVISTOS SUPERIORES A LOS 2 000 MG/KG SIN NECESIDAD DE ENSAYO**

Los criterios de la categoría de peligro 5 tienen por objeto permitir la identificación de sustancias que tengan un peligro de toxicidad aguda relativamente bajo pero que, en determinadas circunstancias, puedan representar un peligro para poblaciones vulnerables. Estas sustancias se prevé que tengan una $DL_{50}$ oral o dérmica dentro del intervalo 2 000-5 000 mg/kg o dosis equivalentes por otras vías. Las sustancias estudiadas podrían clasificarse en la categoría de peligro definida por: 2 000 mg/kg < $DL_{50}$ < 5 000 mg/kg (categoría 5 del SAM), en los siguientes casos:

a) cuando cualquiera de los esquemas de ensayo del anexo 2 lleve a esta categoría, basándose en las cifras de mortalidad;

b) cuando se disponga ya de datos fiables que indiquen que la $DL_{50}$ se sitúa dentro del intervalo de los valores de la categoría 5 o cuando otros estudios con animales o los efectos tóxicos observados en las personas indiquen un peligro agudo para la salud humana;

c) mediante extrapolación, estimación o medición de datos si no está justificada la clasificación en una categoría más peligrosa, y

   — se dispone de información fiable que indique la existencia de efectos tóxicos significativos en los seres humanos, o

   — se observe mortalidad cuando se efectúen ensayos hasta la categoría 4 por vía oral, o

   — cuando los dictámenes de expertos confirmen que se dan signos clínicos significativos de toxicidad al efectuar ensayos hasta los valores de la categoría 4, excepto en el caso de diarrea, piloerección o aspecto despeinado, o

   — cuando los dictámenes de expertos confirmen información fiable obtenida a partir de otros estudios con animales que indique un potencial de efectos agudos significativos.

**ENSAYOS A DOSIS SUPERIORES A 2 000 MG/KG**

Excepcionalmente, y solo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otro nivel de dosis fija superior de 5 000 mg/kg Reconociendo la necesidad de proteger el bienestar animal, se desaconseja el ensayo a la dosis 5 000 mg/kg. Este solo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal (9).

**Estudio preliminar**

Las normas para la toma de decisiones que rigen el procedimiento secuencial del anexo 1 se amplían de manera que incluyan el nivel de dosis 5 000 mg/kg Por tanto, cuando se emplee una dosis inicial en el estudio preliminar de 5 000 mg/kg, el resultado A (muerte) obligará a que se haga un ensayo con otro animal a 2 000 mg/kg; los resultados B y C (toxicidad manifiesta o no toxicidad) permitirán la selección de la dosis de 5 000 mg/kg como dosis inicial del estudio principal. De la misma manera, si se utiliza una dosis inicial distinta de 5 000 mg/kg se pasará a la de 5 000 mg/kg en caso de que se den los resultados B o C a 2 000 mg/kg; un posterior resultado A a 5 000 mg/kg determinará una dosis inicial para el estudio principal de 2 000 mg/kg y los resultados B y C determinarán una dosis inicial para el estudio principal de 5 000 mg/kg.

▼B

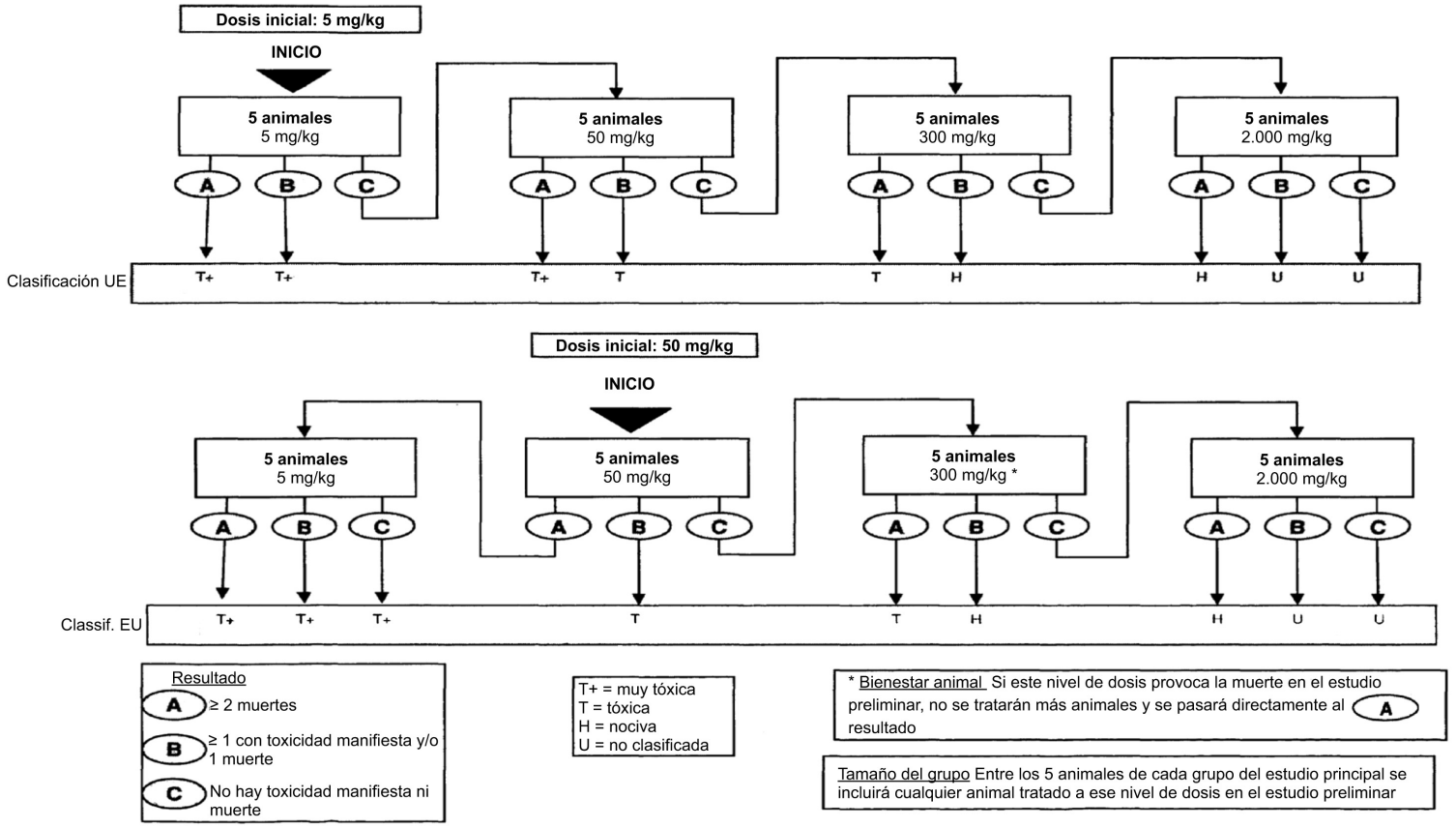
**Estudio principal**

Las normas para la toma de decisiones que rigen el procedimiento secuencial del anexo 2 se amplían de manera que incluyan el nivel de dosis de 5 000 mg/kg. Por tanto, cuando se emplee una dosis inicial en el estudio principal de 5 000 mg/kg, el resultado A (> 2 muertes) obligará a que se haga un ensayo con un segundo grupo a 2 000 mg/kg; el resultado B (toxicidad manifiesta y/o < 1 muerte) o C (no toxicidad) determinará que la sustancia se considere no clasificada con arreglo al SAM. De la misma manera, si se utiliza una dosis inicial distinta de 5 000 mg/kg se pasará a la de 5 000 mg/kg en caso de que se dé un resultado C a 2 000 mg/kg; un posterior resultado A a 5 000 mg/kg dará lugar a que la sustancia se clasifique en la categoría 5 del SAM y los resultados B y C a que se considere no clasificada.

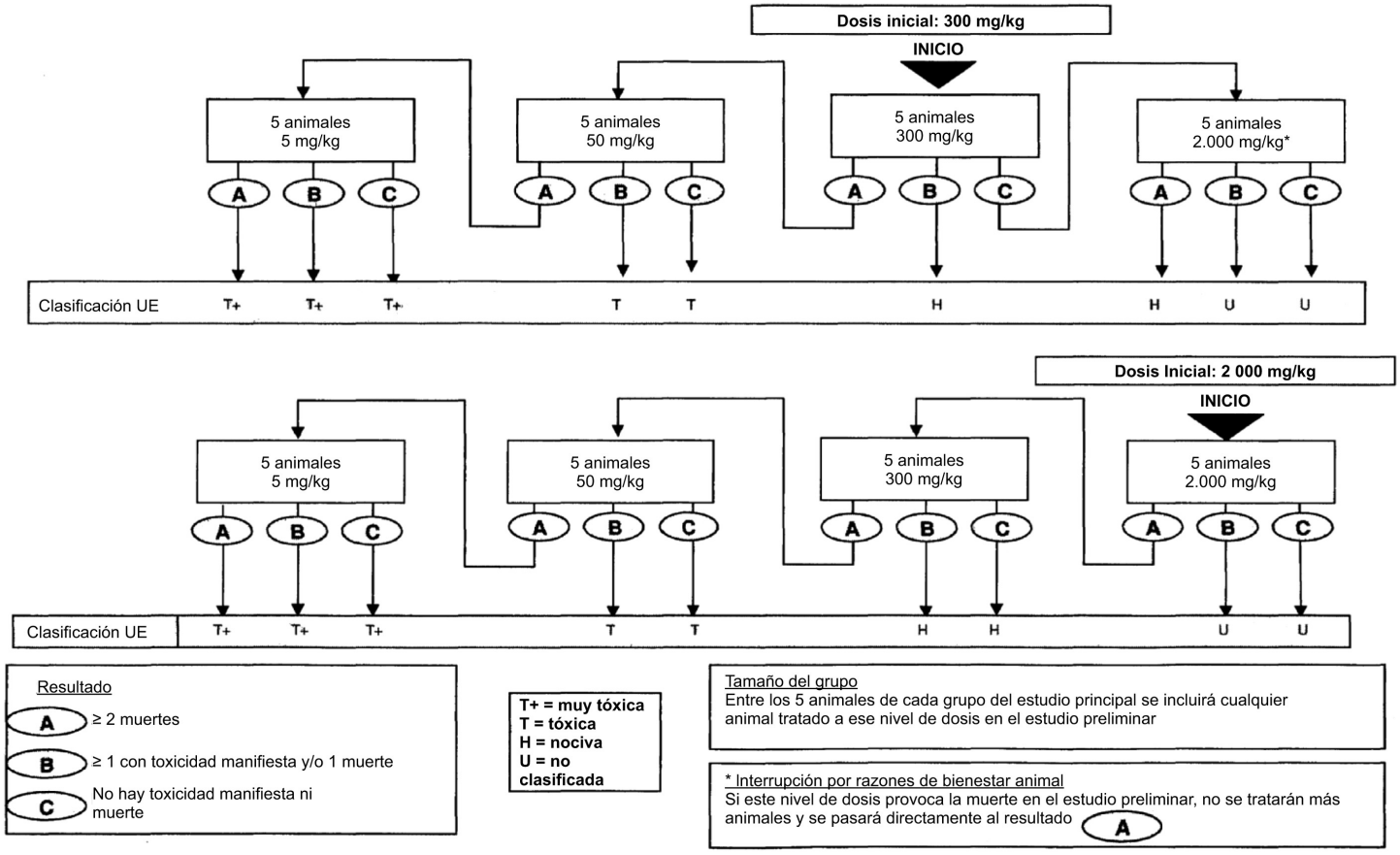
*ANEXO 4*

## MÉTODO DE PRUEBA B.1 bis

**Orientaciones sobre clasificación según el plan comunitario para el período de transición hasta la plena aplicación del Sistema Armonizado Mundial (SAM) [tomado de (8)]**



▼B


Dosis inicial: 300 mg/kg
INICIO
5 animales 5 mg/kg
5 animales 50 mg/kg
5 animales 300 mg/kg
5 animales 2.000 mg/kg*
A B C
Clasificación UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Dosis Inicial: 2 000 mg/kg
INICIO
5 animales 5 mg/kg
5 animales 50 mg/kg
5 animales 300 mg/kg
5 animales 2.000 mg/kg
A B C
Clasificación UE
T+ T+ T+ T T H H U U
Resultado
A ≥ 2 muertes
B ≥ 1 con toxicidad manifiesta y/o 1 muerte
C No hay toxicidad manifiesta ni muerte
T+ = muy tóxica
T = tóxica
H = nociva
U = no clasificada
Tamaño del grupo
Entre los 5 animales de cada grupo del estudio principal se incluirá cualquier animal tratado a ese nivel de dosis en el estudio preliminar
* Interrupción por razones de bienestar animal
Si este nivel de dosis provoca la muerte en el estudio preliminar, no se tratarán más animales y se pasará directamente al resultado A

▼B

B.1 *ter* **TOXICIDAD ORAL AGUDA. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA**

1. **MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 423 (2001).

1.1 INTRODUCCIÓN

El método de las clases de toxicidad aguda (1) establecido en este ensayo es un procedimiento por fases en el que se utilizan 3 animales de un mismo sexo en cada fase. Según la mortalidad y/o la aparición de síntomas de agonía en los animales, pueden requerirse 2-4 fases para juzgar sobre la toxicidad aguda de la sustancia estudiada. Este procedimiento es reproducible, utiliza muy pocos animales y permite clasificar sustancias de manera semejante a los demás métodos de ensayo de toxicidad aguda. El método de las clases de toxicidad aguda se basa en evaluaciones biométricas (2) (3) (4) (5) con dosis fijas, separadas adecuadamente de manera que permitan ordenar una sustancia con fines de clasificación y evaluación de riesgos. Este método en su versión de 1996 fue validado ampliamente *in vivo* con respecto a datos $DL_{50}$ tomados de la bibliografía, tanto a nivel nacional (6) como internacional (7).

En el Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8) se dan directrices sobre la selección del método de ensayo más adecuado en función del objetivo. Además, en este documento orientativo se facilita información complementaria sobre la realización e interpretación del método de ensayo B.l *ter*.

No es necesario administrar dosis de las que se sepa que producen dolor y sufrimiento acusados por sus efectos corrosivos o muy irritantes. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo serán sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En otro documento orientativo (9) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

El método utiliza dosis previamente definidas y los resultados permiten ordenar y clasificar las sustancias de acuerdo con el Sistema Armonizado Mundial (SAM) [Globally Harmonised System (GHS)] de clasificación de sustancias químicas que causan toxicidad aguda (10).

En principio, con este método no se pretende calcular una $DL_{50}$ precisa, sino determinar unas gamas de exposición definidas en las que puede esperarse la aparición de letalidad, ya que la muerte de una parte de los animales sigue siendo su parámetro principal. El método permite la determinación del valor $DL_{50}$ solo cuando al menos dos dosis producen una mortalidad superior al 0 % e inferior al 100 %. La utilización de dosis previamente definidas, independientemente de la sustancia que se ensaye, y la relación explícita entre la clasificación y el número de animales observados en diferentes estados, mejora la concordancia entre la información facilitada por distintos laboratorios, así como la repetibilidad.

▼B

El laboratorio que haga los ensayos debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia estudiada antes de llevar a cabo el estudio. Tal información incluirá la identidad y la estructura química de la sustancia sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de otros ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo,* los datos toxicológicos sobre otras sustancias estructuralmente relacionadas, y el uso o usos previstos de la sustancia. Esta información es necesaria para que todos los afectados puedan estar seguros de que el ensayo es pertinente para la protección de la salud humana y ayuda a la selección de la dosis inicial más adecuada.

1.2 DEFINICIONES

**Toxicidad oral aguda:** efectos nocivos que se manifiestan tras la administración oral de una dosis única de la sustancia o de dosis múltiples dadas dentro de un período de 24 horas.

**Muerte retardada** significa que el animal no muere ni parece moribundo en el plazo de 48 horas sino que muere más tarde durante el período de observación de 14 días.

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo administrada. La dosis se expresa en peso de la sustancia de ensayo por unidad de peso del animal sometido al experimento (por ejemplo, mg/kg).

**SAM:** Sistema Armonizado Mundial [Globally Harmonised System (GHS)] de clasificación y etiquetado de productos químicos. Actividad conjunta de la OCDE (salud humana y medio ambiente), el Comité de Expertos en Transporte de Mercaderías Peligrosas de las Naciones Unidas (propiedades físico-químicas) y la OIT (comunicación de riesgos), coordinada por el Programa Interorganismos para la Gestión Racional de Sustancias Químicas (IOMC, en sus siglas inglesas).

**Muerte inminente:** fase en la que se prevé que el animal muera o entre en la agonía antes del siguiente momento de observación previsto. Entre los signos que indican esta situación en los roedores cabe citar: convulsiones, posición lateral, posición yacente y temblores. [Para más información véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (9)].

**$DL_{50}$ (dosis letal mediana):** dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia capaz de provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. El valor de la $DL_{50}$ se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (mg/kg).

**Dosis límite:** dosis del límite máximo del ensayo (2 000 o 5 000 mg/kg).

**Agonía:** situación en la que el animal se está muriendo o es incapaz de sobrevivir aunque reciba tratamiento. [Para más información véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (9)].

**Muerte previsible:** presencia de signos clínicos que indican la muerte en un momento conocido del futuro antes de la terminación prevista del experimento, por ejemplo: incapacidad de alcanzar alimentos o agua. [Para más información, véase el *Humane Endpoint Guidance Document* (9)].

▼B

1.3 PRINCIPIO DEL MÉTODO

El principio en el que se inspira el ensayo, basado en un procedimiento por fases en cada una de las cuales se utiliza un número mínimo de animales, es obtener información sobre la toxicidad aguda de la sustancia estudiada que sea suficiente para permitir su clasificación. La sustancia se administra por vía oral a un grupo de animales de experimentación a una de las dosis definidas. En el ensayo se sigue un procedimiento por fases, utilizándose en cada fase tres animales del mismo sexo (normalmente hembras). Según la ausencia o presencia de mortalidad debida a la sustancia en los animales tratados en una fase determinada se decide cuál será la fase siguiente, es decir:

— terminación del ensayo (no se requieren más ensayos),

— administración de la misma dosis de la sustancia a otros tres animales,

— administración de la dosis inmediatamente superior o inferior a otros tres animales.

En el anexo 1 se dan detalles del procedimiento del ensayo. El método permitirá emitir un juicio respecto a la clasificación de la sustancia en una clase de toxicidad dentro de una serie de clases definidas mediante valores límite de $DL_{50}$.

1.4 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1 **Selección de la especie animal**

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Normalmente se emplean hembras (9). Se hace así porque la bibliografía sobre los ensayos convencionales de $DL_{50}$ muestra que normalmente hay poca diferencia en cuanto a sensibilidad entre los sexos, pero, en los casos en que se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles (11). Sin embargo, si se conocen propiedades toxicológicas o toxicocinéticas de sustancias químicas estructuralmente relacionadas que indiquen que es probable que los machos sean más sensibles, deberá utilizarse este sexo. Cuando el ensayo se haga con machos, deberá justificarse adecuadamente.

Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El animal, al inicio de la administración de la sustancia, debe tener entre 8 y 12 semanas de edad y su peso debe estar en un intervalo del ± 20 % del peso medio de los animales a los que previamente se haya administrado la sustancia.

1.4.2 **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede darse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por dosis, pero el número de animales de cada jaula no debe obstaculizar la realización de observaciones claras de cada animal.

▼B

1.4.3 **Preparación de los animales**

Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar la administración de la sustancia, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

1.4.4 **Preparación de las dosis**

En general, las sustancias estudiadas deben administrarse en un volumen constante para toda la gama de dosis que deban ensayarse, variando la concentración del preparado administrado. Sin embargo, cuando deba administrarse una mezcla o producto final líquidos, puede resultar más adecuado para la posterior evaluación de riesgos utilizar la sustancia no diluida, es decir, a una concentración constante. Algunas autoridades reguladoras establecen este criterio con carácter obligatorio. En cualquiera de los dos casos, no debe superarse el volumen de dosis máximo. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. En los roedores, el volumen no debe sobrepasar 1 ml/100 g de peso corporal, excepto en el caso de las soluciones acuosas, de las que se pueden usar 2 ml/100 g de peso corporal. En cuanto a la formulación del preparado que se administre, se recomienda el uso de una solución/suspensión/emulsión acuosa siempre que sea posible, seguida, en orden de preferencia, por una solución/suspensión/emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y luego posiblemente por la solución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Las dosis tienen que prepararse poco antes de la administración a menos que se conozca la estabilidad del preparado durante el período en que se vaya a utilizar y conste que esta es aceptable.

1.5 PROCEDIMIENTO

1.5.1 **Administración de las dosis**

La sustancia estudiada se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o cánula adecuada de intubación. Cuando se dé el caso, poco habitual, de que no pueda administrarse una dosis única, se podrá dividir esta en pequeñas partes durante un período que no sobrepase las 24 horas.

Los animales se mantendrán en ayunas antes de la administración de la dosis (por ejemplo, las ratas no deberán recibir alimento alguno durante la noche, pero sí agua; los ratones no deberán recibir alimento durante 3-4 horas, pero sí agua). Tras el período de ayuno, los animales se pesarán antes de la administración de la sustancia estudiada. Una vez administrada esta, podrá continuarse el ayuno durante unas 3 o 4 horas en el caso de las ratas y 1 o 2 horas cuando se trate de ratones. Si se administra la dosis en pequeñas partes a lo largo de un cierto período podrá ser necesario dar comida y bebida a los animales, en función de la duración de dicho período.

1.5.2 **Número de animales y dosis**

Se utilizarán tres animales en cada fase. La dosis inicial se seleccionará entre las cuatro dosis fijas, es decir, 5, 50, 300 y 2 000 mg/kg de peso corporal. La dosis inicial será la que produzca con mayor probabilidad la muerte de algunos de los animales a los que se administre. En los diagramas del anexo 1 se describe el procedimiento que debe seguirse para cada una de las dosis iniciales. Además, el anexo 4 da orientaciones sobre la clasificación en el sistema comunitario hasta que se aplique el nuevo SAM.

▼B

Cuando la información indique que no es probable la aparición de mortalidad con la dosis inicial máxima (2 000 mg/kg peso corporal), se realizará una prueba límite. Si no hay información sobre una sustancia estudiada, por razones de bienestar animal, se recomienda utilizar como dosis inicial 300 mg/kg peso corporal.

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

Excepcionalmente, y solo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de otro nivel de dosis superior de 5 000 mg/kg (véase el anexo 2). Por razones de bienestar animal, se desaconseja el ensayo en animales de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial (2 000-5 000 mg/kg). Este ensayo solo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal o del medio ambiente.

1.5.3 **Ensayo límite**

El ensayo límite se utiliza en situaciones en las que el experimentador tiene información de que la sustancia estudiada es probable que no sea tóxica, es decir, solo resulta tóxica por encima de las dosis límite reglamentarias. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos, mezclas o productos ensayados semejantes, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en la que se prevé que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.

Podrá realizarse un ensayo límite con una sola dosis de 2 000 mg/kg peso corporal con seis animales (tres por fase). Podrá realizarse un ensayo límite con una sola dosis de 5 000 mg/kg peso corporal con tres animales (véase el anexo 2). Si aparece mortalidad debida a la sustancia, puede ser necesario realizar una prueba complementaria al nivel inmediatamente inferior.

1.6 OBSERVACIONES

Tras la administración de la dosis, se observan los animales uno por uno, al menos una vez durante los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas, prestando especial atención durante las primeras 4 horas, y a continuación diariamente, a lo largo de un total de 14 días, excepto cuando tengan que eliminarse del estudio y sacrificarse de manera compasiva por razones de bienestar animal o bien cuando resulten muertos. Sin embargo, no se debería fijar rígidamente la duración de la observación sino que esta debe determinarse según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la longitud del período de recuperación, por lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos (12). Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal.

▼B

Será necesario hacer más observaciones si los animales siguen presentando signos de toxicidad. Entre las observaciones deben incluirse los cambios de la piel y del pelaje, ojos y membranas mucosas, y también de los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso (central y autónomo), así como la actividad locomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el *Humane Endpoints Guidance Document* (8). Los animales moribundos y los que muestren dolor intenso y signos continuos de sufrimiento intenso deberán sacrificarse de forma compasiva. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

1.6.1 **Peso corporal**

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

1.6.2 **Patología**

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

2. **RESULTADOS**

Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, se reunirán todos los resultados en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la necropsia.

3. **INFORME**

3.1 **Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

Sustancia estudiada:

— naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización),

— identificación química, incluido el número CAS.

Vehículo (si procede):

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua. Animales sometidos a ensayo:

especie y cepa utilizadas,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

▼B

— número, edad y sexo de los animales (incluida, cuando proceda, una justificación del uso de machos en vez de hembras),

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones de ensayo:

— información sobre la formulación de la sustancia de ensayo, incluida la forma física del material administrado,

— datos de la administración de la sustancia, incluidos el volumen y el momento de la administración,

— datos sobre la calidad del agua y los alimentos (incluido el origen/tipo de la dieta y el origen del agua),

— justificación de la elección de la dosis inicial.

Resultados:

— tabulación de las respuestas y los niveles de dosis de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad naturaleza, gravedad y duración de los efectos),

— tabulación del peso corporal y los cambios en el mismo,

— peso de cada animal el día en que se administre la dosis, posteriormente a intervalos semanales, y en el

— momento de la muerte o el sacrificio,

— fecha y hora de la muerte si es anterior al sacrificio previsto,

— cronología de la aparición de signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal,

— resultados de la necropsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

Evaluación e interpretación de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336-341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute- Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559-610

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729-734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/$LC_{50}$ Tests. ALTEX 16, 129-134

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic- Class Method-An Alternative to the $LD_{50}$ Test. Arch. Toxicol. 66, 455-470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Cíass Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659-670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental. Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnetl.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380, EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional $LD_{50}$, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223-231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology.* Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

*ANEXO 1*

**PROCEDIMIENTO QUE DEBE SEGUIRSE PARA CADA UNA DE LAS DOSIS INICIALES**

*OBSERVACIONES GENERALES*

Para cada dosis inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

— Anexo 1 a: la dosis inicial es 5 mg/kg de peso corporal.

— Anexo 1 b: la dosis inicial es 50 mg/kg de peso corporal.

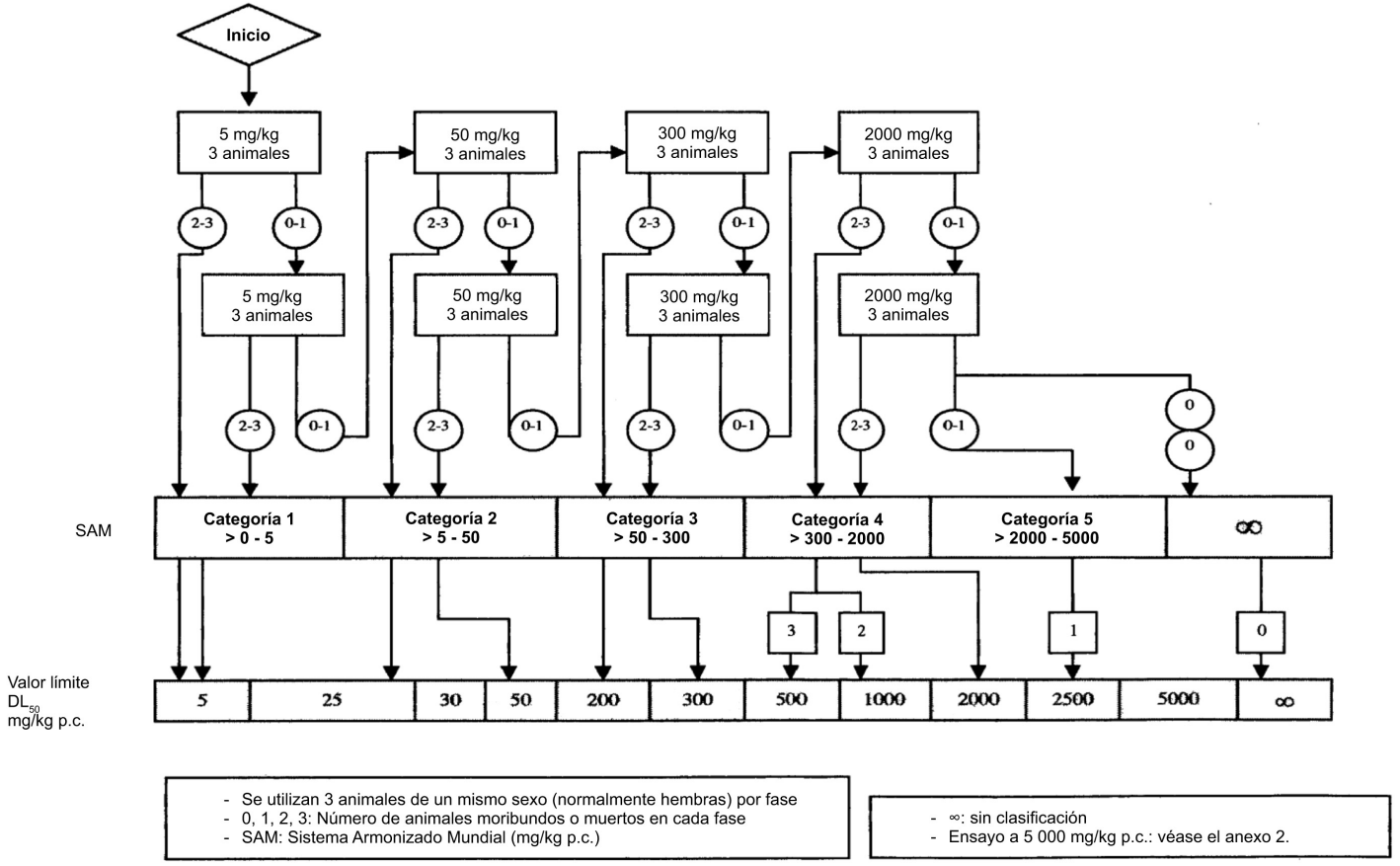
— Anexo 1 c: la dosis inicial es 300 mg/kg de peso corporal.

— Anexo 1 d: la dosis inicial es 2 000 mg/kg de peso corporal.

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

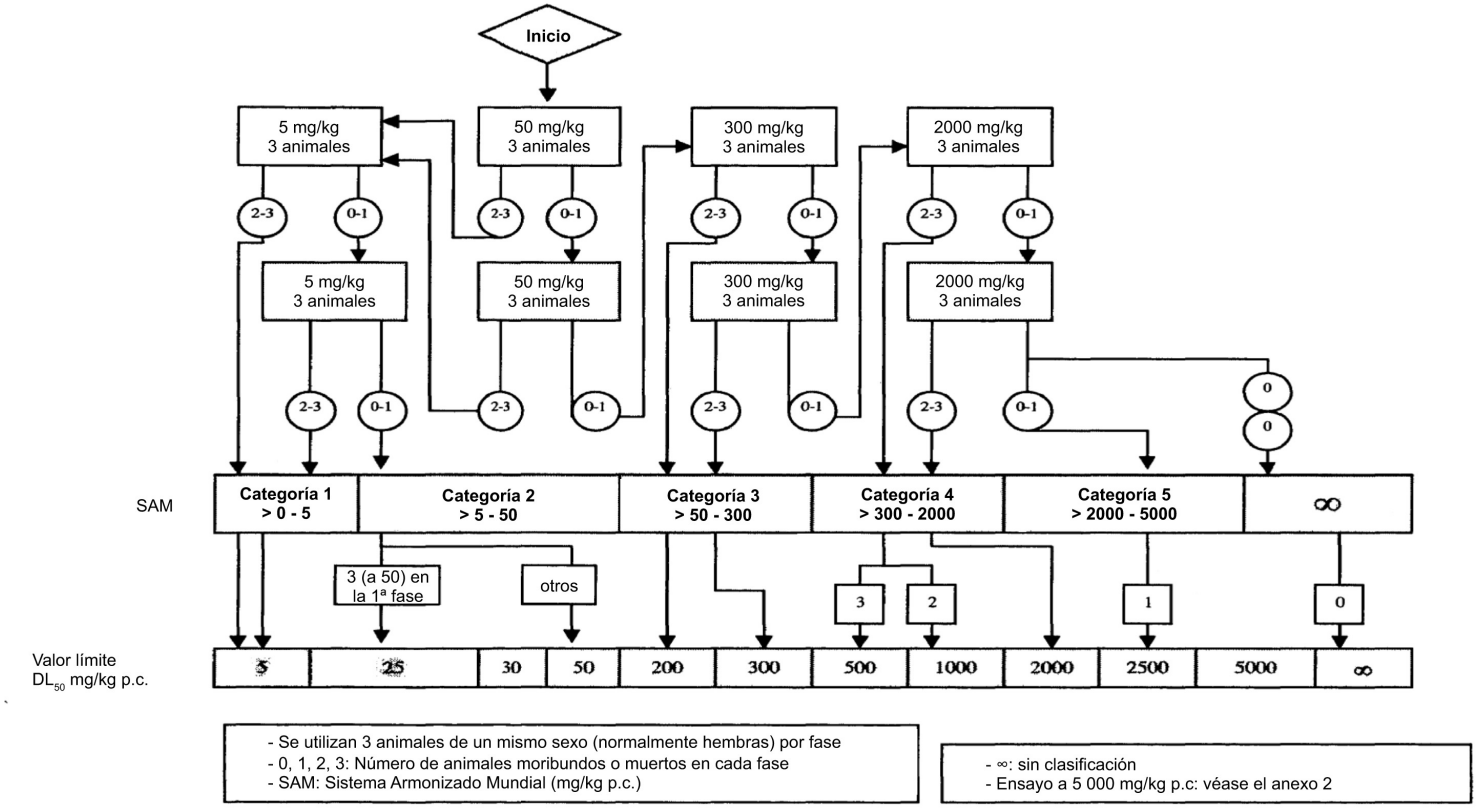
*Anexo 1 A*

**PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 5 MG/KG DE PESO CORPORAL**



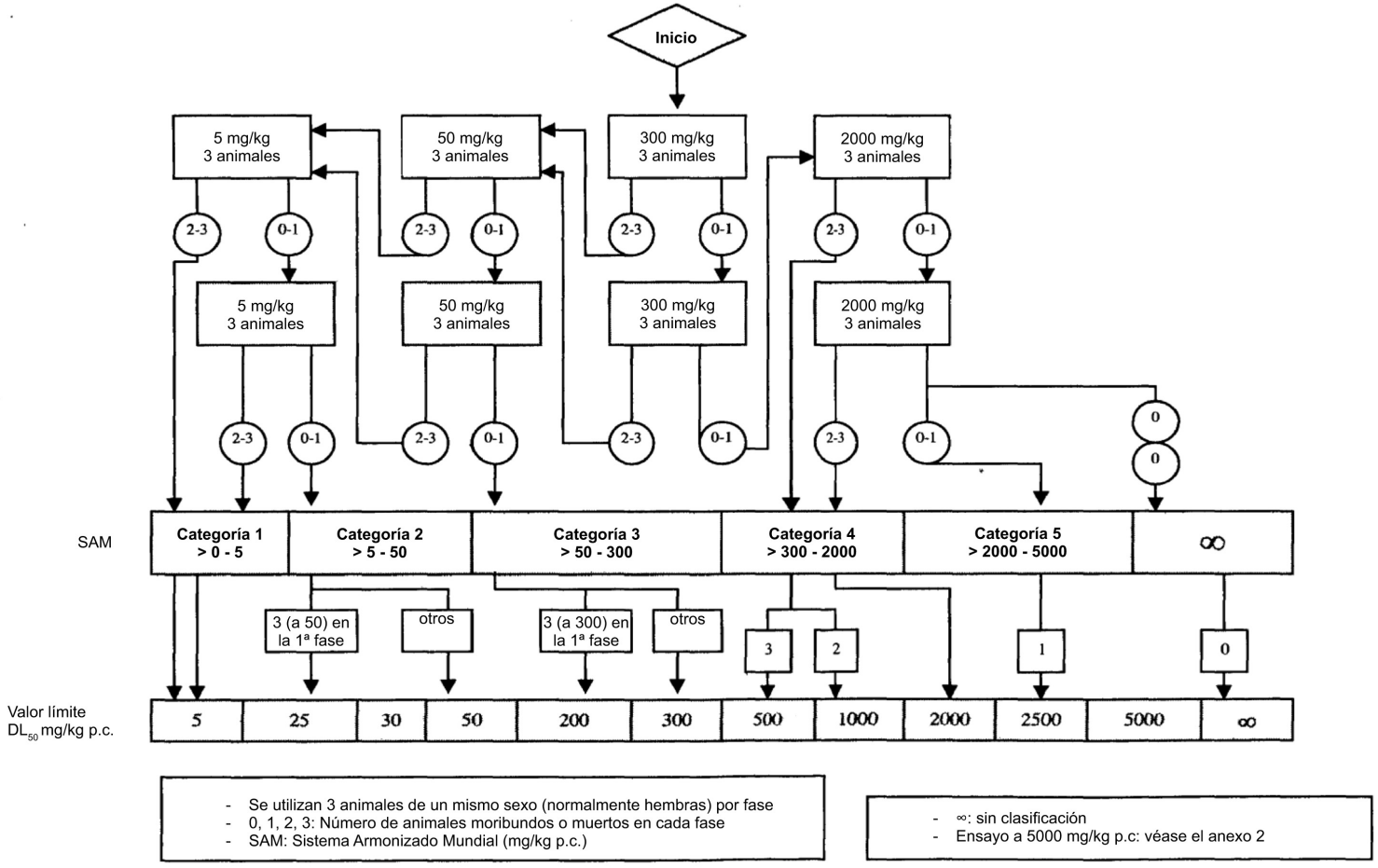
*ANEXO 1B*

**PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 50 MG/KG DE PESO CORPORAL**



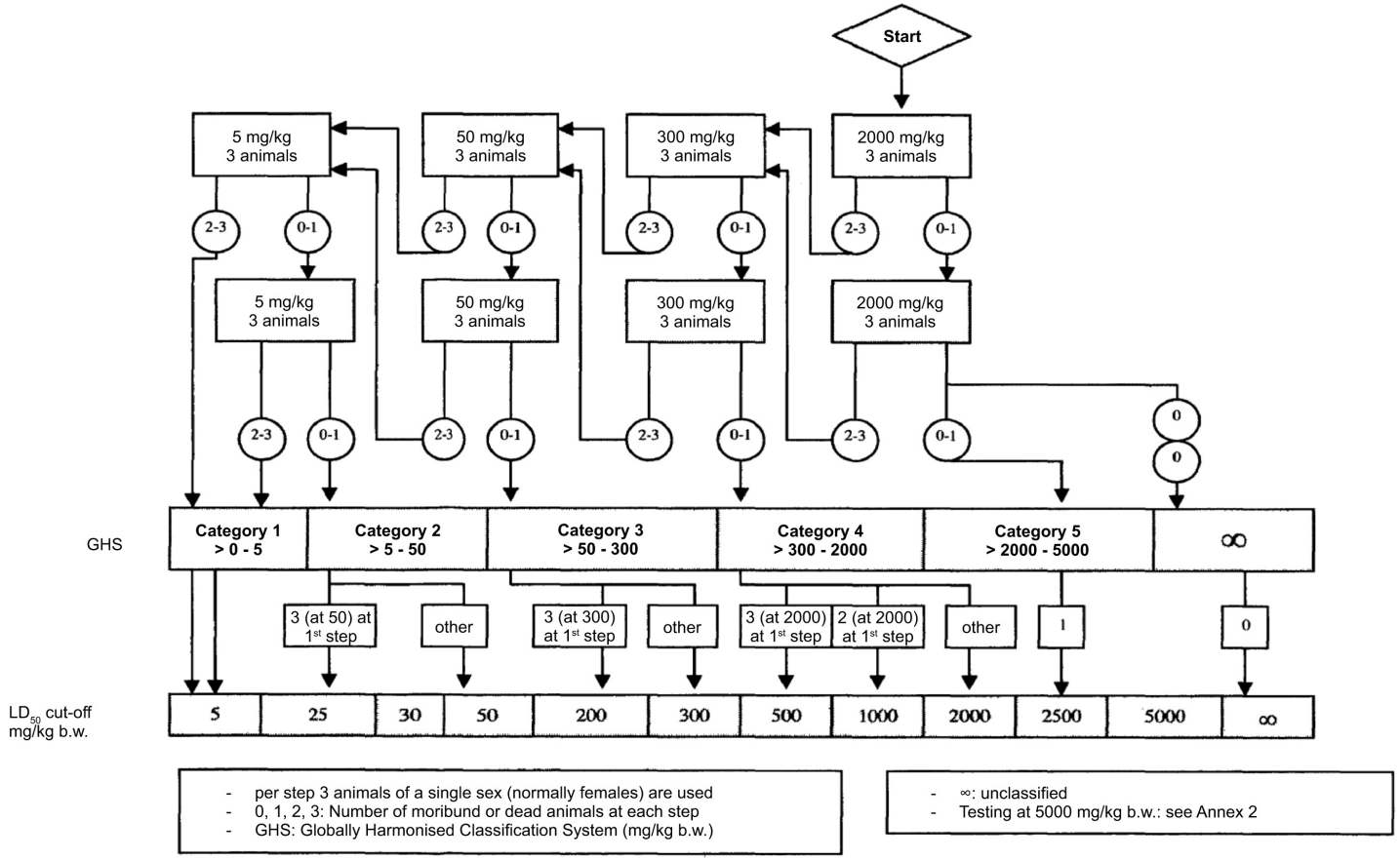
*ANEXO 1C*

**PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 300 MG/KG DE PESO CORPORAL**



*ANEXO 1 D*

**PROCEDIMIENTO DE ENSAYO CON UNA DOSIS INICIAL DE 2 000 MG/KG DE PESO CORPORAL**



▼B

*ANEXO 2*

**CRITERIOS PARA LA CLASIFICACIÓN DE SUSTANCIAS CON VALORES $DL_{50}$ PREVISTOS SUPERIORES A LOS 2 000 MG/KG SIN NECESIDAD DE ENSAYO**

Los criterios de la categoría de peligro 5 tienen por objeto permitir la identificación de sustancias que tengan un peligro de toxicidad aguda relativamente bajo pero que, en determinadas circunstancias, puedan representar un peligro para poblaciones vulnerables. Estas sustancias se prevé que tengan una $DL_{50}$ oral o dérmica dentro del intervalo 2 000-5 000 mg/kg o dosis equivalentes por otras vías. Las sustancias estudiadas deben clasificarse en la categoría de peligro definida por 2 000 mg/kg < $DL_{50}$ < 5 000 mg/kg (categoría 5 del SAM), en los siguientes casos:

a) cuando cualquiera de los esquemas de ensayo del anexo 1a-1d lleve a esta categoría, basándose en las cifras de mortalidad;

b) cuando se disponga ya de datos fiables que indiquen que la $DL_{50}$ se sitúa dentro del intervalo de los valores de la categoría 5; o cuando otros estudios en animales o los efectos tóxicos observados en las personas susciten inquietud grave acerca de la salud humana;

c) mediante extrapolación, estimación o medición de datos si no está justificada la clasificación en una categoría más peligrosa, y

   — se dispone de información fiable que indique la existencia de efectos tóxicos significativos en los seres humanos, o

   — se observe mortalidad cuando se efectúen ensayos hasta la categoría 4 por vía oral, o

   — cuando los dictámenes de expertos confirmen que se dan signos clínicos significativos de toxicidad al efectuar ensayos hasta los valores de la categoría 4, excepto en el caso de diarrea, piloerección o aspecto alterado, o

   — cuando los dictámenes de expertos confirmen información fiable obtenida a partir de otros estudios en animales que indique un potencial de efectos agudos significativos.

**ENSAYOS A DOSIS SUPERIORES A 2 000 MG/KG**

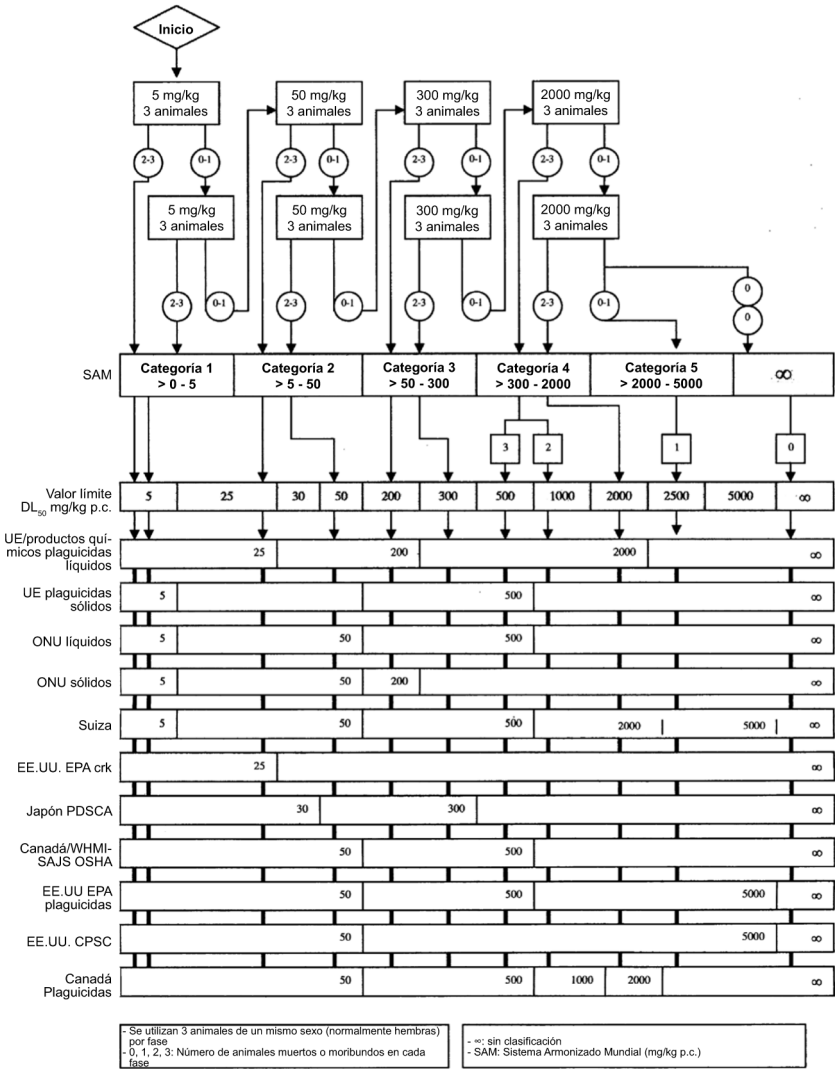
Reconociendo la necesidad de proteger el bienestar animal, se desaconseja el ensayo de la categoría 5 del Sistema Armonizado Mundial (2 000-5 000 mg/kg) con animales. Este solo debe plantearse cuando sea muy probable que sus resultados sirvan directamente para la protección de la salud humana o animal (10). No deben hacerse otros ensayos a dosis superiores.

Cuando tenga que hacerse un ensayo a 5 000 mg/kg, solo se requiere una fase (es decir, tres animales). Si el primer animal al que se administre la dosis muere, se pasará a la dosis de 2 000 mg/kg de acuerdo con los diagramas del anexo 1. Si el primer animal sobrevive, se tratará a dos animales más. Si muere solo uno de los tres animales, se prevé que la $DL_{50}$ supere los 5 000 mg/kg. Si ambos animales mueren, se pasará a la dosis de 2 000 mg/kg.

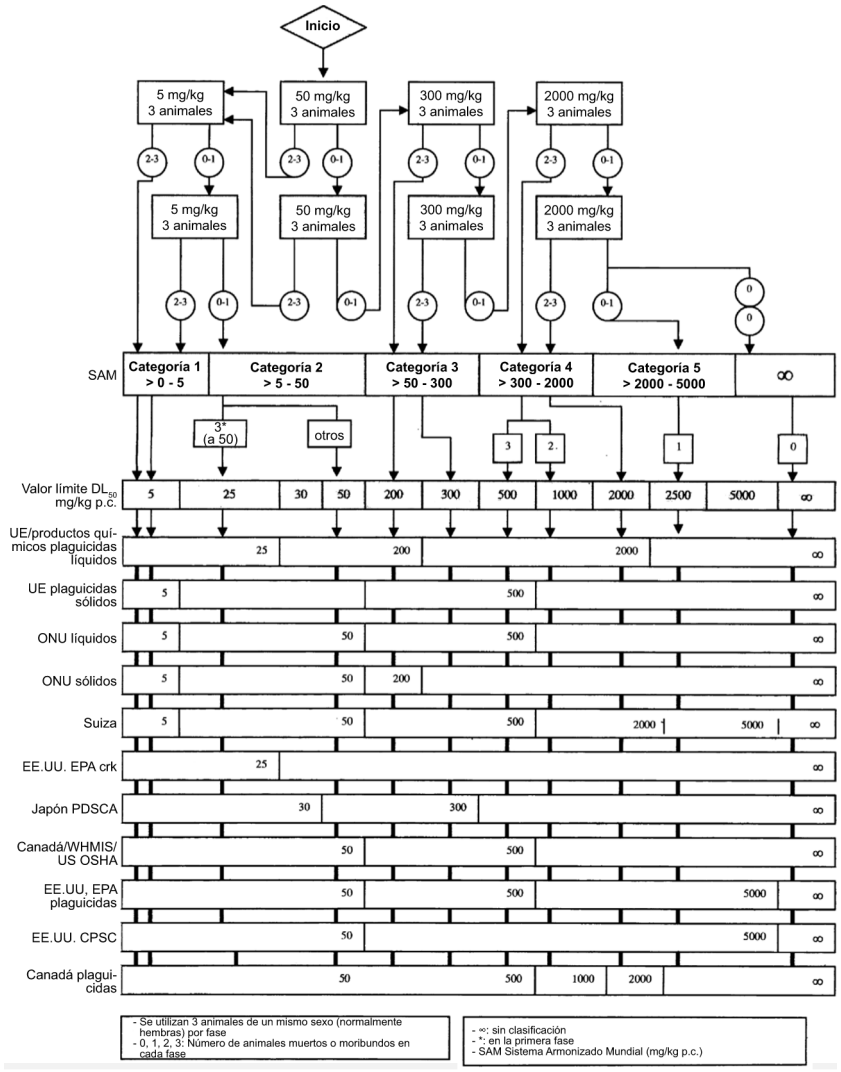
▼B

*ANEXO 3*

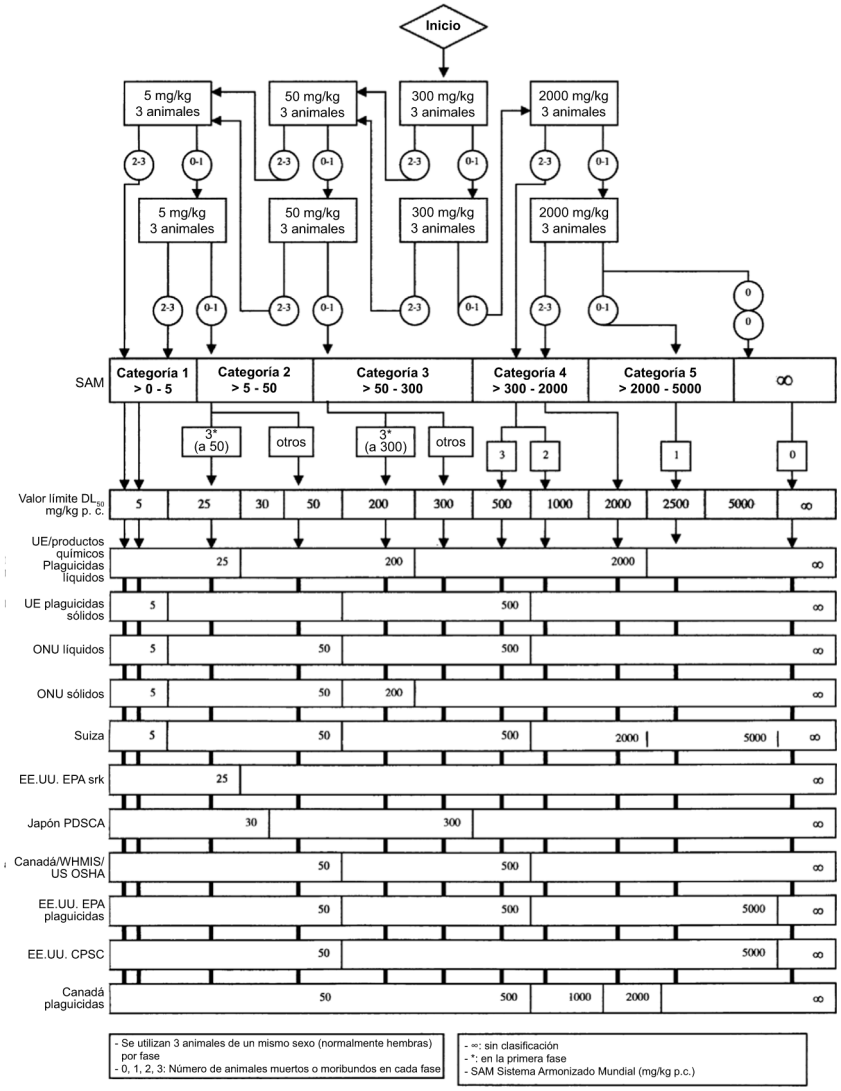
**Método de prueba B.1 *ter*: Orientaciones sobre clasificación según el plan comunitario para el período de transición hasta la plena aplicación del Sistema Armonizado Mundial (SAM) [tomado de (8)]**



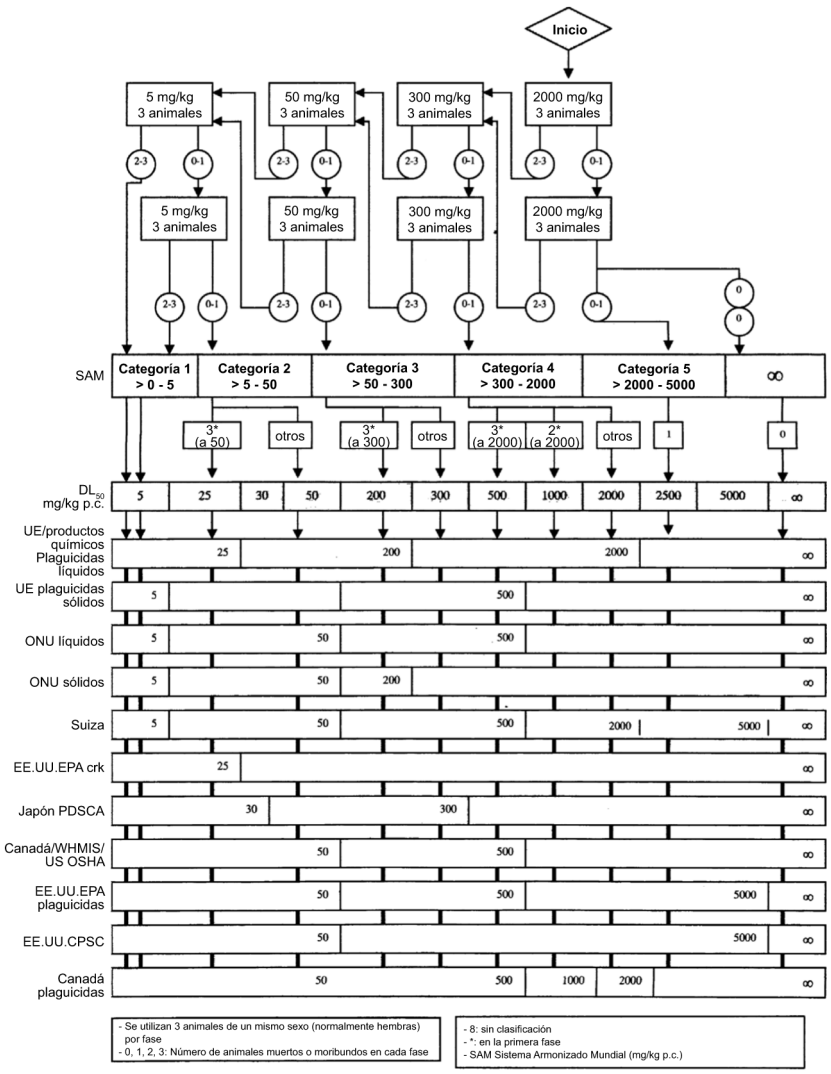
▼B


Inicio
5 mg/kg 3 animales
50 mg/kg 3 animales
300 mg/kg 3 animales
2000 mg/kg 3 animales
2-3
0-1
0
SAM
Categoría 1 > 0 - 5
Categoría 2 > 5 - 50
Categoría 3 > 50 - 300
Categoría 4 > 300 - 2000
Categoría 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
otros
Valor límite DL50 mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/productos químicos plaguicidas líquidos
UE plaguicidas sólidos
ONU líquidos
ONU sólidos
Suiza
EE.UU. EPA crk
Japón PDSCA
Canadá/WHMIS/ US OSHA
EE.UU. EPA plaguicidas
EE.UU. CPSC
Canadá plaguicidas
- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
- 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase
- ∞: sin clasificación
- *: en la primera fase
- SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)

▼B


Inicio
5 mg/kg 3 animales
50 mg/kg 3 animales
300 mg/kg 3 animales
2000 mg/kg 3 animales
2-3
0-1
0
SAM
Categoría 1 > 0 - 5
Categoría 2 > 5 - 50
Categoría 3 > 50 - 300
Categoría 4 > 300 - 2000
Categoría 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
otros
3* (a 300)
3
2
1
Valor límite DL50 mg/kg p. c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/productos químicos Plaguicidas líquidos
UE plaguicidas sólidos
ONU líquidos
ONU sólidos
Suiza
EE.UU. EPA srk
Japón PDSCA
Canadá/WHMIS/ US OSHA
EE.UU. EPA plaguicidas
EE.UU. CPSC
Canadá plaguicidas
- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
- 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase
- ∞: sin clasificación
- *: en la primera fase
- SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)

▼B


Inicio
5 mg/kg 3 animales
50 mg/kg 3 animales
300 mg/kg 3 animales
2000 mg/kg 3 animales
2-3
0-1
0
SAM
Categoría 1 > 0 - 5
Categoría 2 > 5 - 50
Categoría 3 > 50 - 300
Categoría 4 > 300 - 2000
Categoría 5 > 2000 - 5000
∞
3* (a 50)
otros
3* (a 300)
3* (a 2000)
2* (a 2000)
1
DL50 mg/kg p.c.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
UE/productos químicos Plaguicidas líquidos
UE plaguicidas sólidos
ONU líquidos
ONU sólidos
Suiza
EE.UU.EPA crk
Japón PDSCA
Canadá/WHMIS/ US OSHA
EE.UU.EPA plaguicidas
EE.UU.CPSC
Canadá plaguicidas
- Se utilizan 3 animales de un mismo sexo (normalmente hembras) por fase
- 0, 1, 2, 3: Número de animales muertos o moribundos en cada fase
- 8: sin clasificación
- *: en la primera fase
- SAM Sistema Armonizado Mundial (mg/kg p.c.)

▼M4

## B.2. **TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN**

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 403 de la OCDE (2009) (1). Las directrices 403 (TG 403) original para ensayos de toxicidad aguda por inhalación fueron adoptadas en 1981. El presente método de ensayo B.2 (que se considera equivalente a las TG 403 revisadas) se ha diseñado para hacerlo más flexible, reducir el uso de animales y respetar la normativa legal. El método de ensayo revisado contempla dos tipos de estudios: un protocolo de $CL_{50}$ tradicional y un protocolo de concentración × tiempo (C × t). La principal característica de este método de ensayo es su capacidad de proporcionar una relación concentración-respuesta con resultados desde no letales hasta letales que permite obtener la concentración letal mediana ($CL_{50}$), la concentración umbral no letal (por ejemplo, $CL_{01}$) y la pendiente, además de identificar una posible susceptibilidad ligada al sexo. Deberá emplearse un protocolo C × t cuando exista una necesidad científica o normativa específica que imponga la investigación con animales en diferentes períodos, como es el caso de la planificación de actuaciones de urgencia [por ejemplo, para obtener los niveles orientativos de la exposición aguda (Acute Exposure Guideline Levels, AEGL), (las directrices de planificación de la respuesta en situaciones de emergencia (Emergency Response Planning Guidelines ERPG), o los niveles umbral de exposición aguda (Acute Exposure Threshold Levels, AETL)] o de la planificación del uso del suelo.

2. Se encontrará una guía para la realización e interpretación de estudios según este método de ensayo en el "Documento de orientación sobre los ensayos de toxicidad por inhalación aguda" [*Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39)] (2).

3. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en GD 39 (2).

4. Este método de ensayo permite hacer una caracterización de la sustancia química problema y una evaluación cuantitativa del riesgo, además de ordenar y clasificar los compuestos químicos con arreglo al Reglamento (CE) nº 1272/2008 (3). El GD 39 (2) proporciona una orientación para seleccionar el método de ensayo adecuado a los estudios de toxicidad aguda. Cuando solamente se necesite información sobre la clasificación y el etiquetado, se recomienda de manera general consultar el capítulo B.52 de este anexo (4) [véase el GD 39 (2)]. El presente método de ensayo B.2 no ha sido concebido específicamente para el análisis de productos especializados, como materiales fibrosos o isométricos escasamente solubles o nanomateriales manufacturados.

### CONSIDERACIONES INICIALES

5. Antes de considerar la aplicación de este método de ensayo y con el fin de minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de análisis deberá tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia problema, sin olvidar los estudios existentes [consúltese, por ejemplo, el capítulo B.52 de este anexo (4)] cuyos datos pudieran desaconsejar la realización de nuevas investigaciones. En la selección de especie, variedad, sexo, modo de exposición y concentraciones analíticas adecuadas serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo,* los usos y la posible exposición humana previstos, los cálculos (Q)SAR y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias estructuralmente afines [véase el GD 39 (2)].

▼M4

6. En la medida de lo posible, deberá evitarse la investigación de sustancias irritantes o corrosivas que previsiblemente vayan a provocar dolor o daños intensos. Con objeto de esclarecer si es posible prescindir de nuevas investigaciones, el potencial corrosivo/irritante deberá ser evaluado por expertos sobre la base de la experiencia en hombres y animales (por ejemplo, estudios de administración continuada realizados con concentraciones no corrosivas/irritantes), los datos *in vitro* existentes [consúltense los capítulos B.40 (5) y B.40 *bis* (6) del presente anexo o las TG 435 de la OCDE (7)], los valores de pH, la información acerca de sustancias afines o cualquier otro dato pertinente. En caso de necesidades normativas específicas (por ejemplo, a los fines de planificar actuaciones de urgencia), se podrá aplicar el presente método de ensayo para exponer animales a los productos mencionados, por cuanto permite al investigador principal o al director del estudio un control sobre la selección de las concentraciones de exposición. Ahora bien, las concentraciones previstas no deberán provocar efectos de irritación/corrosión graves, pero sí suficientes para ampliar la curva de concentración-respuesta a un intervalo que cubra el objetivo normativo y científico del ensayo. Estas concentraciones se seleccionarán según cada caso y se justificará debidamente la selección [véase el GD 39 (2)].

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Este método de ensayo B.2 revisado se ha concebido para obtener una información acerca de la toxicidad aguda de la sustancia problema suficiente para permitir su clasificación, así como los datos de letalidad (por ejemplo, $CL_{50}$, $CL_{01}$ y pendiente) de uno o ambos sexos que se precisen para la evaluación cuantitativa del riesgo. El presente método de ensayo consta de dos métodos. El primer método es un protocolo tradicional en el que varios grupos de animales se exponen a una concentración límite (ensayo límite) o a una serie de concentraciones progresivas durante un período predeterminado que suele ser de 4 horas. Pueden aplicarse otros tiempos de exposición con fines normativos específicos. El segundo método es un protocolo de C × t en el que los grupos de animales se exponen a una sola concentración (límite) o a una serie de concentraciones durante diferentes períodos.

8. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva y en la interpretación del resultado serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (*Guidance Document on Humane Endpoints*) (8) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

9. Hay que usar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie recomendada es la rata y, en caso de usar otra especie, se justificará debidamente.

**Preparación de los animales**

10. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la exposición, los animales serán adultos jóvenes de 8 a 12 semanas de edad y la diferencia máxima de su peso corporal respecto del peso medio de su sexo calculado en animales previamente expuestos de la misma edad y sexo será del ± 20 %. Los animales se seleccionan al azar y se marcan para permitir su identificación individual. Se mantienen en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio. Deberán también aclimatarse al equipo del ensayo durante un breve período preliminar, para así reducir el estrés provocado por la introducción en un entorno nuevo.

▼M4

**Zootecnia**

11. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales de forma indebida tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad.

**Cámaras de inhalación**

12. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo por la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzan mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el GD 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

**Administración de las concentraciones**

13. Las exposiciones solo por la nariz en las ratas pueden tener cualquier duración hasta un máximo de 6 horas. En los ratones, las exposiciones solo por la nariz no deben sobrepasar en principio las 4 horas. Si se requieren tiempos experimentales más prolongados deberán justificarse [véase el GD 39 (2)]. Los animales expuestos a aerosoles en cámaras de cuerpo entero se enjaularán de manera individual para evitar la ingestión de la sustancia problema debido a las conductas de limpieza de los compañeros de jaula. Se suprimirá la alimentación durante el período de exposición. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.

14. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico que debe utilizarse dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará la sustancia problema durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas.

▼M4

**Granulometría**

15. Se controlará la granulometría de todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 4 μm, con una desviación típica geométrica ($\sigma_g$) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (2) (9) (10). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Por ejemplo, los humos metálicos pueden tener un diámetro de partícula menor, mientras que las partículas con carga, las fibras y las sustancias higroscópicas (que aumentan de tamaño en el medio húmedo de las vías respiratorias) pueden sobrepasar este límite de referencia.

**Preparación de la sustancia problema en un vehículo**

16. Se puede recurrir a un vehículo para crear una concentración y un tamaño de partícula adecuados de la sustancia problema en la atmósfera. Por regla general se dará preferencia al agua. El material particulado se puede someter a tratamientos mecánicos para obtener la granulometría deseada, pero procurando no descomponer ni alterar la sustancia problema. Cuando se considere que los procesos mecánicos pueden haber alterado la composición de la sustancia problema (por ejemplo, las temperaturas extremas de una fricción excesiva por un proceso de trituración), esta se verificará analíticamente. Se pondrá especial atención para no contaminar la sustancia problema. No es necesario analizar compuestos granulados no friables que han sido intencionadamente formulados como no inhalables. Se recurrirá a una prueba de desgaste para demostrar que no se generan partículas respirables durante la manipulación del material granulado. Si en la prueba de desgaste se generan sustancias respirables, habrá que efectuar un ensayo de toxicidad por inhalación.

**Animales de control**

17. No es necesario emplear un grupo de control negativo (con aire) en paralelo. Si se usa un vehículo distinto del agua para generar la atmósfera experimental, solo será necesario recurrir a un grupo de control del vehículo cuando no se disponga de datos anteriores de toxicidad por inhalación. Si un ensayo de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada; por lo tanto, no hay necesidad de controlar el vehículo.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

**Caudal de aire de la cámara**

18. El caudal de aire de la cámara se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión de la concentración (o estabilidad) atmosférica del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de interés en la generación de una atmósfera. Se pondrá especial atención para evitar la reinspiración en las cámaras de exposición solo por la nariz en aquellos casos en los que el caudal de aire a través del sistema de exposición sea insuficiente para crear un flujo continuo del medio atmosférico problema. Se han prescrito metodologías capaces de demostrar que no tiene lugar la reinspiración en las condiciones operativas establecidas (2) (11). La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a conseguir estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases.

▼M4

**Temperatura y humedad relativa de la cámara**

19. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. La humedad relativa en la zona de respiración de los animales, cuando se trate de exposiciones de solo por la nariz y de cuerpo entero, se supervisará y registrará al menos tres veces en operaciones de hasta 4 horas, y cada hora en operaciones más cortas. La humedad relativa debe mantenerse idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia problema en el método de ensayo).

**Sustancia problema: concentración nominal**

20. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en esta generación.

**Sustancia problema: concentración real**

21. La concentración real es la concentración de sustancia problema presente en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior caracterización analítica) o con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material en el aire es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, el aire) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trate de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases. En el informe del estudio se harán constar las concentraciones diana, nominales y reales, pero en los análisis estadísticos destinados a calcular los valores de concentración letal se emplean solo las concentraciones reales.

22. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema, y la muestra de ensayo se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa bajo el pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases u otras determinaciones. Aunque la identidad de la muestra problema no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

23. La atmósfera de exposición se mantendrá constante en la medida de lo posible y bajo supervisión continua y/o intermitente, dependiendo del método analítico. Si la técnica de muestreo es intermitente, habrá que tomar muestras de la atmósfera de la cámara por lo menos dos veces en un ensayo de cuatro horas. De no ser esto posible por darse concentraciones bajas o un caudal de aire limitado, se podrá tomar una sola muestra en todo el período de exposición. Si se producen fluctuaciones importantes de una muestra a otra, para analizar las siguientes concentraciones se tomarán cuatro muestras

▼M4

por exposición. Las concentraciones individuales de la cámara no deben desviarse de la concentración media en más de ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, y en más de ± 20 % en caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y registrará el tiempo de equilibrado de la cámara ($t_{95}$). La duración de cualquier exposición abarca el tiempo que tarda en generarse la sustancia problema, y tiene en cuenta el tiempo necesario para alcanzar $t_{95}$. En el documento de orientación GD 39 (2) se ofrecen indicaciones para el cálculo de $t_{95}$.

24. Cuando se manejen mezclas muy complejas de gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos de uso final con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación, de modo que se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla y no solo de la sustancia o el componente activo (analito). En el documento de orientación GD nº 39 (2) se ofrece más información acerca de las concentraciones reales.

**Sustancia problema: granulometría**

25. La granulometría de los aerosoles se determinará al menos dos veces por cada período de exposición de 4 horas, empleando un impactador de cascada o un aparato alternativo como un medidor del tamaño aeorodinámico de partícula. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de impacto, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración de masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir la exposición. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases (véase el punto 15).

PROCEDIMIENTO

26. A continuación se describen dos tipos de estudios: el protocolo tradicional y el protocolo de C × t. Ambos protocolos pueden englobar un estudio preliminar, un estudio principal y/o un ensayo límite (protocolo tradicional) o de concentración límite (C × t). Cuando se sabe que uno de los sexos presenta mayor sensibilidad, el director del estudio podrá decidir que los ensayos se realicen solo en este. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Antes de comenzar el ensayo, se tomarán en consideración todos los datos disponibles para minimizar el uso de animales. Así, los datos a los que se refiere el capítulo B.52 del presente anexo (4) pueden obviar la necesidad de hacer un estudio preliminar, como también demostrar la mayor sensibilidad de uno de los sexos [véase GD 39 (2)].

▼M4

PROTOCOLO TRADICIONAL

**Consideraciones generales: protocolo tradicional**

27. En un estudio tradicional, se exponen lotes de animales a una sustancia problema durante un período establecido (generalmente 4 horas) en una cámara de exposición solo por la nariz o de cuerpo entero. Los animales se exponen a una concentración límite (ensayo límite) o bien a un mínimo de tres concentraciones progresivas (estudio principal). Puede realizarse un estudio preliminar antes del estudio principal, salvo que se disponga de alguna información acerca de la sustancia problema, como un estudio efectuado antes siguiendo el método del capítulo B.52 [véase GD 39 (2)].

**Estudio preliminar: protocolo tradicional**

28. Se recurre al estudio preliminar para calcular la potencia de la sustancia problema, identificar las diferencias de sensibilidad en función del sexo y seleccionar los niveles de exposición que se aplicarán en el estudio principal o en el ensayo límite. Para seleccionar los niveles de concentración que se aplicarán en el estudio preliminar se recurrirá a toda la información disponible, incluidos datos de (Q)SAR y los datos de sustancias afines a la estudiada. A cada concentración no se expondrán más de tres machos y tres hembras (suele ser el mínimo necesario para establecer una diferencia en función del sexo). El estudio preliminar puede versar sobre una sola concentración, pero en caso necesario se pueden analizar más concentraciones. Un estudio preliminar nunca comportará un número de animales y de concentraciones tan elevado como un estudio principal. El estudio preliminar puede sustituirse por un estudio B.52 (4) previamente realizado [véase GD 39 (2)].

**Ensayo límite: protocolo tradicional**

29. El ensayo límite se practica cuando se sabe o supone que la sustancia problema es prácticamente atóxica, es decir, que induce una respuesta tóxica solo cuando supera la concentración límite normativa. En un ensayo límite, un único lote compuesto por tres machos y tres hembras es expuesto a la sustancia problema a una concentración límite. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre compuestos afines teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se dispone de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en que se prevé que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal.

30. La selección de las concentraciones límite depende generalmente de los requisitos normativos. En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente (o la concentración máxima alcanzable) (3). Puede resultar técnicamente complicado generar concentraciones límite de algunas sustancias problema, especialmente de vapores y aerosoles. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (MMAD de 1-4 μm). Este se consigue a una concentración de 2 mg/l para la mayoría de las sustancias problema. El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase GD 39 (2)]. El Reglamento (CE) nº 1272/2008 desaconseja los estudios que superen las concentraciones límite por razones de bienestar animal (3). El estudio de la concentración límite solo se contemplará cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir directamente en la protección de la salud humana (3), lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes del ensayo límite, para confirmar que se pueden crear en la cámara las condiciones adecuadas para dicho ensayo límite.

▼M4

31. Si con la concentración límite se encuentran animales muertos o moribundos, los resultados del ensayo límite pueden servir de estudio preliminar para nuevos ensayos con otras concentraciones (véase el estudio principal). Si las propiedades físicas o químicas de una sustancia problema hacen imposible obtener una concentración límite, se estudiará la concentración máxima alcanzable. Si con la concentración máxima alcanzable la letalidad es inferior al 50 %, no son necesarios nuevos estudios. En caso de no obtener una concentración límite, el informe del estudio deberá facilitar una explicación respaldada con datos. Si la concentración máxima alcanzable de un vapor no induce toxicidad, puede ser necesario generar la sustancia problema en forma de aerosol líquido.

**Estudio principal: protocolo tradicional**

32. El estudio principal se realiza típicamente con cinco machos y cinco hembras (o 5 animales del sexo más sensible, si se conoce) por nivel de concentración, aplicando como mínimo tres niveles de concentración. Deben emplearse niveles de concentración suficientes para obtener un análisis estadístico sólido. El intervalo de tiempo entre los grupos de exposición se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. La exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente estudiados. Ello permitirá al director del estudio ajustar la concentración diana a la que se expondrá el siguiente lote. Dada la dependencia de tecnologías sofisticadas, esto no siempre es factible en los estudios de inhalación, por lo que la exposición de los animales al siguiente nivel de concentración deberá basarse en la opinión científica y la experiencia previas. Consúltese el documento de orientación GD 39 (2) cuando se estudien mezclas.

PROTOCOLO DE CONCENTRACIÓN × TIEMPO (C × T)

**Consideraciones generales: protocolo de C × t**

33. El estudio de C × t en progresión secuencial representa una alternativa al protocolo tradicional en los ensayos de toxicidad por inhalación (12) (13) (14). Con este método los animales se pueden exponer a distintas concentraciones de una sustancia problema durante períodos variables. La totalidad del estudio tiene lugar en una cámara de exposición solo por la nariz (las cámaras de cuerpo entero no resultan prácticas en este tipo de estudios). El protocolo se ilustra en un diagrama de flujo del apéndice 1. Un análisis de simulación ha demostrado que tanto el protocolo tradicional como el de C × t son capaces de rendir valores de $CL_{50}$ sólidos, pero que el protocolo de C × t proporciona en general valores más sólidos de $CL_{01}$ y de $CL_{10}$ (15).

34. Un análisis de simulación ha demostrado que el uso de dos animales por intervalo de C × t (uno de cada sexo, o bien dos del sexo más sensible) es en general adecuado cuando se analizan 4 niveles de concentración y 5 tiempos de exposición en un estudio principal. En algunas circunstancias, el director del estudio puede decidir el empleo de dos ratas por sexo y por intervalo de C × t (15). El empleo de 2 animales por sexo y por valor de concentración y tiempo puede reducir el sesgo y la variabilidad de los valores estimados, aumentar el porcentaje de éxito de la estimación y mejorar el intervalo de confianza. No obstante, si el ajuste de los datos para la estimación es insuficiente (cuando se usa un animal de cada sexo o dos animales del sexo más sensible), puede bastar con agregar un quinto nivel de exposición. En GD 39 (2) se ofrecen más orientaciones sobre el número de animales y las concentraciones que deben aplicarse en un estudio de C × t.

▼M4

**Estudio preliminar: protocolo de C × t**

35. Se hace un estudio preliminar para estimar la potencia de la sustancia problema y seleccionar los niveles de exposición que se aplicarán en el estudio principal. Pueden tener que usarse hasta tres animales por sexo y concentración en el estudio preliminar [consúltense los detalles en el apéndice III del documento de orientación GD 39 (2)] para determinar la concentración inicial adecuada del estudio principal y reducir al mínimo el número de animales utilizados. Para establecer diferencias en función del sexo puede ser necesario emplear tres animales por sexo. Estos animales deberán someterse a una exposición única, por lo general de 240 minutos. La capacidad de generar una atmósfera experimental adecuada se establecerá en pruebas técnicas previas realizadas sin animales. Por lo regular, no será necesario realizar un estudio preliminar cuando existan datos de mortalidad obtenidos de un estudio previo según el capítulo B.52 (4). Al seleccionar la concentración diana inicial en un estudio B.2, el director del estudio tendrá en cuenta las pautas de mortalidad observadas en los estudios B.52 (4) previos, en relación con los sexos y con todas las concentraciones estudiadas [véase GD 39 (2)].

**Concentración inicial: protocolo de C × t**

36. La concentración inicial (sesión de exposición I) (apéndice 1) será una concentración límite o bien una concentración seleccionada por el director del estudio sobre la base de un estudio preliminar. Lotes de 1 animal/sexo se exponen a esta concentración durante diferentes períodos (por ejemplo, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos), hasta sumar un total de 10 animales (es lo que llamamos sesión de exposición I) (apéndice 1).

37. La selección de las concentraciones límite depende generalmente de los requisitos normativos. En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente (o la concentración máxima alcanzable) (3). Puede resultar técnicamente complicado generar concentraciones límite de algunas sustancias problema, especialmente de vapores y aerosoles. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (es decir, un MMAD de 1-4 μm) a una concentración límite de 2 mg/l. Esto se consigue con la mayoría de las sustancias problema. El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase GD 39 (2)]. El Reglamento (CE) nº 1272/2008 desaconseja los estudios que superen la concentración límite por razones de bienestar animal (3). Los estudios que superen la concentración límite solo se contemplarán cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir directamente en la protección de la salud humana (3), lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes de comenzar el estudio a la concentración inicial, para confirmar que se crean en la cámara las condiciones adecuadas a esa concentración.

38. Si con la concentración inicial se encuentran animales muertos o moribundos, los resultados obtenidos con esta concentración pueden servir como punto de partida para nuevos ensayos con otras concentraciones (véase el estudio principal). Si las propiedades físicas o químicas de una sustancia problema hacen imposible obtener una concentración límite, se estudiará la concentración máxima alcanzable. Si con la concentración máxima alcanzable la letalidad es inferior al 50 %, no son necesarios nuevos estudios. En caso de no poder obtener una concentración límite, el informe del estudio deberá facilitar una explicación respaldada con datos. Si la concentración máxima alcanzable de un vapor no induce toxicidad, puede ser necesario generar la sustancia problema en forma de aerosol líquido.

▼M4

**Estudio principal: protocolo de C × t**

39. La concentración inicial (sesión de exposición I) (apéndice 1) analizada en el estudio principal será una concentración límite o bien una concentración seleccionada por el director del estudio sobre la base de un estudio preliminar. Si en el transcurso o después de la sesión de exposición I se observa mortalidad, la exposición mínima (C × t) que genere mortalidad se tomará como guía para establecer la concentración y los tiempos de la sesión de exposición II. Cada sesión de exposición sucesiva dependerá de la sesión anterior (véase el apéndice 1).

40. En el caso de muchas sustancias problema, los resultados obtenidos con la concentración inicial, unidos a los de otras tres sesiones de exposición con un cuadriculado temporal más denso (es decir, el espaciado geométrico de los períodos de exposición, indicado por el factor entre los períodos sucesivos, generalmente $\sqrt{2}$), serán suficientes para establecer la relación de mortalidad C × t (15); sin embargo, puede resultar conveniente agregar un quinto nivel de exposición [véanse el apéndice 1 y el documento de orientación GD 39 (2)]. En el apéndice 1 se describe el tratamiento matemático de los resultados del protocolo C × t.

OBSERVACIONES

41. Los animales se someterán a observación clínica frecuente durante el período de exposición. Las observaciones clínicas se llevarán a cabo al menos dos veces el día de la exposición, o más frecuentemente si lo indica la respuesta de los animales al tratamiento, y en lo sucesivo al menos una vez al día durante un período total de 14 días. La duración del período de observación no es fija, antes bien deberá determinarse en función de la naturaleza y del tiempo de aparición de los signos clínicos y de la longitud del período de recuperación. Son importantes los momentos en que aparezcan y desaparezcan los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de tales signos de toxicidad. Todas las observaciones se anotarán sistemáticamente en los registros individuales abiertos para cada animal. Por razones de bienestar animal, los animales moribundos o que den muestras de dolor fuerte o signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva. En el momento de explorar los signos clínicos de toxicidad, se procurará que el mal aspecto inicial y los trastornos respiratorios transitorios, eventualmente derivados del procedimiento de exposición, no se confundan con signos de toxicidad química que obligarían al sacrificio prematuro de los animales. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el *Guidance Document on Humane Endpoints* (GD 19) (7). Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

42. Las observaciones en la jaula deberían incluir los cambios en la piel y el pelo, ojos y membranas mucosas, y también los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Cuando sea posible se anotarán las eventuales diferencias entre los efectos locales y los sistémicos. Debe prestarse especial atención a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento.

**Pesos corporales**

43. Los pesos corporales individuales se registrarán una vez durante el período de aclimatación, en el día previo a la exposición (día 0), y al menos en los días 1, 3 y 7 (y, en lo sucesivo, semanalmente) y en el momento de la muerte o de la eutanasia si se produce después del día 1. Se acepta que el peso corporal es un indicador crítico de la toxicidad, por lo que deberán vigilarse estrechamente los animales que muestren una reducción progresiva de peso $\geq$ 20 % en comparación con los valores preliminares. Los animales supervivientes se pesan y se sacrifican de forma compasiva al final del período de post-exposición.

▼M4

**Anatomía patológica**

44. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de descubrir la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a temperaturas suficientemente bajas para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.

45. Se podrán contemplar otras exploraciones incluidas de antemano en el diseño para ampliar el valor interpretativo del estudio, como la medida del peso pulmonar de las ratas que sobrevivan o el examen microscópico de las vías respiratorias para aportar pruebas de irritación. La exploración de órganos puede extenderse a aquellos que muestren signos de anatomopatología macroscópica en los animales que sobreviven 24 o más horas y a los órganos que se saben o suponen afectados. El examen microscópico de la totalidad de las vías respiratorias puede proporcionar información útil en el caso de sustancias problema que son reactivas con el agua, como las de naturaleza ácida o higroscópica.

DATOS E INFORME

**Datos**

46. Se documentarán por separado los datos de peso corporal y los resultados de la autopsia de cada animal. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y su reversibilidad, y los resultados de la autopsia.

**Informe del ensayo**

47. El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

*Animales de experimentación y zootecnia*

— Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.

— Especie o variedad empleada y justificación para el uso de una especie distinta de la rata.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Método de aleatorización.

— Detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua).

— Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

▼M4

*Sustancia problema*

— Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).

— Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

*Vehículo*

— Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).

— Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

*Cámara de inhalación*

— Descripción de la cámara de inhalación, incluidos las dimensiones y el volumen.

— Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.

— Equipo empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

— Fuente de aire, tratamiento del aire suministrado/extraído y sistema de acondicionamiento.

— Métodos de calibración del equipo para garantizar una atmósfera experimental homogénea.

— Diferencia de presión (positiva o negativa).

— Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en el sistema (de cuerpo entero).

— Homogeneidad/estabilidad temporal de la atmósfera experimental.

— Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.

— Caudales de aire, caudal del aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).

— Descripción del equipo empleado para medir el oxígeno y el dióxido de carbono, si procede.

— Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ($t_{95}$) en la cámara de inhalación.

— Número de variaciones de volumen por hora.

— Dispositivos de dosificación (si procede).

*Datos relativos a la exposición*

— Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.

— Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).

— Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que den lugar a estados físicos heterogéneos (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada uno de ellos por separado.

▼M4

— Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (por ejemplo, mg/l, $mg/m^3$, etc.); se podrán indicar además las unidades de volumen (por ejemplo, ppm, ppmm, etc.) entre paréntesis.

— Granulometría, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica ($\sigma_g$), incluidos los correspondientes métodos de cálculo; se documentarán los análisis granulométricos individuales.

*Condiciones del ensayo*

— Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema; cuando exista la posibilidad de que los procesos mecánicos hayan alterado la composición de la sustancia problema, se incluirán los resultados de los análisis realizados para verificar dicha composición.

— Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.

— Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficacia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

— Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

*Resultados*

— Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.

— Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

— Tabulación de los datos de tamaño de partícula, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, granulometría y cálculos de MMAD y $\sigma_g$.

— Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).

— Pesos corporales de cada animal registrados en el estudio; fecha y hora de la muerte si se produce antes de la eutanasia programada; cronología de la aparición de los signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal.

— Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

— Estimaciones de la letalidad (por ejemplo, $CL_{50}$, $DL_{01}$), incluidos los límites de confianza del 95 % y la pendiente (si lo permite el método de evaluación).

— Relación estadística, incluida la estimación del exponente n (protocolo de $C \times t$); se indicará el nombre del paquete informático.

▼M4

*Evaluación e interpretación de los resultados*

— Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para cumplir los criterios del presente método de ensayo, esto es, la concentración límite o el tamaño de partícula.

— Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.

— Se facilitará una explicación de si ha sido preciso sacrificar de forma compasiva animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (*Guidance Document on Humane Endpoints*) (8).

— Cuando se haya interrumpido algún estudio conforme al protocolo descrito en el capítulo B.52 del presente anexo (4) para reemplazarlo por el presente método de ensayo B.2, se harán las justificaciones pertinentes.

— En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.

— Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(3) Reglamento CE nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

(4) Capítulo B.52 del presente anexo. Toxicidad aguda por inhalación. Método de las clases de toxicidad aguda.

(5) Capítulo B.40 del presente anexo. Corrosión cutánea in vitro: Ensayo de Resistencia eléctrica transcutánea (REI).

(6) Capítulo B.40*bis* del presente anexo. Corrosión cutánea in vitro: Ensayo con modelo de piel humana.

(7) OECD (2005), In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(10) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

(11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167.

(12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278-290.

(13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105-117.

(14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65-71.

(15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINICIÓN

**Sustancia problema:** Toda sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼M4

*Apéndice 1*

**Protocolo de C × t**

1. El estudio de concentración × tiempo (C × t) en progresión secuencial representa una alternativa al protocolo tradicional en los ensayos de toxicidad por inhalación (12) (13) (14). Se usará preferentemente cuando exista una necesidad científica o normativa específica que imponga la investigación con animales en diferentes períodos, como es el caso de la planificación de actuaciones de urgencia o del uso del suelo. El protocolo suele comenzar con el estudio de una concentración límite (sesión de exposición I), en el que se exponen los animales a la sustancia problema durante cinco intervalos de tiempo (por ejemplo, 15, 30, 60, 120 y 240 minutos), de modo que dentro de una sesión se investigan distintos tiempos de exposición (véase la figura 1). En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente. Estas concentraciones solo podrán rebasarse cuando exista una necesidad científica o normativa que así lo indique (véase el punto 37 del texto principal de B.2).

2. En los casos en que exista poca o nula información sobre la toxicidad de una sustancia problema se realizará un estudio preliminar, en el que grupos de no más de 3 animales de cada sexo se expondrán a las concentraciones diana seleccionadas por el director del estudio durante 240 minutos como norma general.

3. Si se analiza una concentración límite durante la sesión de exposición I y se observa una mortalidad inferior al 50 %, no hacen falta más ensayos. Si se plantea una necesidad científica o normativa de establecer una relación concentración/tiempo/respuesta a niveles más elevados que la concentración límite indicada, la siguiente exposición se establecerá a un nivel tal que suponga dos veces la concentración límite (es decir, 2L en la figura 1).

4. Si se observa toxicidad a la concentración límite, habrá que hacer nuevos ensayos (estudio principal). Estas exposiciones adicionales tendrán lugar, bien a concentraciones más bajas (en la figura 1: sesiones de exposición II, III o IV'), bien a concentraciones más elevadas pero durante períodos más breves (en la figura 1: sesión de exposición IV), acortando los tiempos de exposición y los intervalos entre ellos.

5. El ensayo (de la concentración inicial y las adicionales) se lleva a cabo empleando 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo, o bien 2 animales del sexo más sensible por valor de concentración/tiempo. En algunas circunstancias, el director del estudio puede decidir el uso de 2 ratas por sexo y por valor de concentración/tiempo (o 4 animales del sexo más sensible por valor de concentración/tiempo) (15). El empleo de 2 animales por sexo y por valor de concentración/tiempo puede reducir el sesgo y la variabilidad de los cálculos, mejorar el porcentaje de éxito de la estimación y aumentar el intervalo de confianza en comparación con el protocolo que se describe aquí. Se ofrece más información en el documento de orientación GD 39 (2).

6. Lo ideal es que cada sesión de exposición se efectúe en un día. Esto concede la oportunidad de retrasar la siguiente exposición hasta obtener una seguridad razonable de la supervivencia, y permite al director del estudio ajustar la concentración diana y los tiempos de la siguiente sesión de exposición. Se recomienda iniciar cada sesión de exposición con el lote que va a estar expuesto más tiempo, es decir, comenzar con el lote de 240 minutos de exposición, seguido del lote de 120 minutos, y así sucesivamente. Si, por ejemplo, los animales del lote de 240 minutos mueren ya a los 90 minutos o muestran signos graves de toxicidad (por ejemplo, alteraciones importantes de la pauta de respiración, como dificultad al respirar), carece de sentido exponer otro lote a un tiempo de 120 minutos ya que la mortalidad será probablemente del 100 %. De modo que el director del estudio seleccionará tiempos de exposición más breves para esa concentración (por ejemplo, 90, 65, 45, 33 y 25 minutos).

▼M4

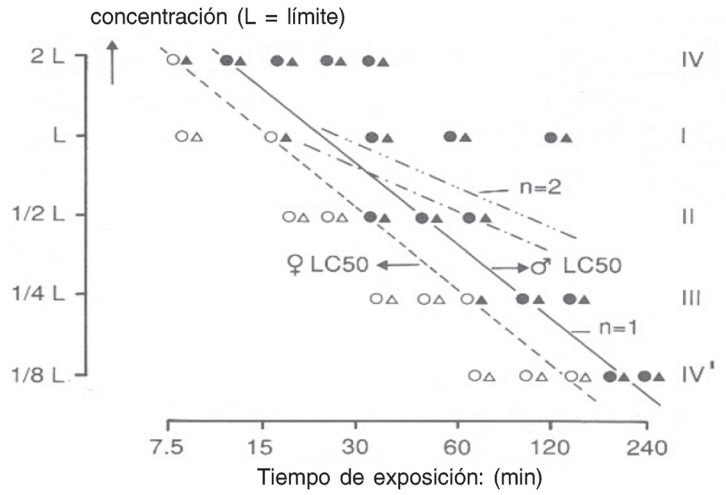
7. La concentración de la cámara se medirá con frecuencia para determinar la concentración media ponderada de cada período de exposición. Siempre que sea posible, se tomará para el análisis estadístico el momento de la muerte de cada animal (mejor que la duración de la exposición).

8. Los resultados de las cuatro primeras sesiones de exposición se analizarán con objeto de detectar lagunas en los datos de la curva de concentración-tiempo (véase la figura 1). En caso de ajuste insuficiente, se podrá proceder a una nueva exposición (5ª concentración). En ella, la concentración y los períodos de exposición se elegirán para cubrir la laguna detectada.

9. Se tomarán todas las sesiones de exposición (incluida la primera) para calcular la relación concentración-tiempo-respuesta aplicando el análisis estadístico (16). En la medida de lo posible, por cada intervalo de C × t se tomarán la concentración media ponderada en función del tiempo y la duración de la exposición hasta el momento de la muerte (si esta se produce durante la exposición).

*Figura 1*

**Ilustración hipotética de la relación concentración-tiempo-mortalidad en la rata**




Símbolos huecos = animales supervivientes; símbolos macizos = animales muertos

Triángulos = hembras; círculos = machos

Línea continua = valores de $CL_{50}$ (intervalo de 7,5-240 min) de los machos, n = 1

Línea de trazos = valores de $CL_{50}$ (intervalo de 7,5-240 min) de las hembras, n = 1

Líneas de puntos = valores hipotéticos de $CL_{50}$ de machos y hembras, bajo el supuesto de n igual a 2 (12).

Glosario

Concentración:

Tiempo de exposición:

▼M4

10. A continuación se expone un ejemplo de progresión secuencial:

**Sesión de exposición I — Estudio realizado a la concentración límite (figura 1)**

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total ([a])

— Concentración diana ([b]) = concentración límite.

— Se exponen cinco lotes de animales a esta concentración diana durante períodos de 15, 30, 60, 120 y 240 minutos, respectivamente.

↓

**Sesión de exposición II** ([c])**— Estudio principal**

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

— Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ([d]) (1/2L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor √2; véase la figura 1).

↓

**Sesión de exposición III — Estudio principal**

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

— Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ([d]) (1/4L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor √2; véase la figura 1).

↓

**Sesión de exposición IV' — Estudio principal**

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

— Se exponen cinco lotes de animales a una concentración inferior ([d]) (1/8L) con tiempos de exposición algo más largos (espaciado de factor √2; véase la figura 1).

**↓ o**

([a]) Si no se dispone de datos de sensibilidad en función del sexo, se usarán ratas de ambos sexos, es decir, 1 animal por sexo y por concentración. De existir información previa, o si se pone de manifiesto en esta sesión de exposición que uno de los sexos es más sensible, en los siguientes ensayos se someterán 10 animales del sexo sensible (2 por cada valor de concentración/tiempo) a cada nivel de concentración.

([b]) En virtud del Reglamento (CE) nº 1272/2008, las concentraciones límite de los gases, vapores y aerosoles son de 20 000 ppm, 20 mg/l y 5 mg/l, respectivamente. Si cabe esperar toxicidad o así lo indican los resultados del estudio preliminar, se seleccionarán concentraciones iniciales más bajas. Por necesidades científicas o normativas se podrán aplicar concentraciones más elevadas.

([c]) Idealmente, la exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente tratados. Ello permitirá al director del estudio ajustar la concentración diana y los tiempos de la siguiente sesión de exposición.

([d]) La dosis mínima (concentración × tiempo) capaz de inducir mortalidad en el estudio de la concentración inicial (primera sesión de exposición) se tomará como base para establecer la siguiente combinación de concentración y períodos de exposición. Habitualmente, la concentración se reduce a la mitad (1/2L) y los animales se exponen a un cuadriculado temporal más denso, aplicando una división geométrica de los períodos de exposición según un factor de 1,4 (√2; véase la referencia 11) en torno al tiempo que corresponde a la dosis letal mínima (tiempo × concentración) observada en la primera sesión de exposición. Según la figura 1, en la sesión de exposición I se observó mortalidad por primera vez a los 15 minutos; los tiempos aplicados durante la sesión II, por tanto, se centrarán en torno a los 30 minutos, y serán de 15, 21, 30, 42 y 60 min. Después de las dos primeras exposiciones, resulta muy aconsejable proyectar los resultados en una gráfica semejante a la indicada más arriba, y comprobar si la relación entre concentración y tiempo presenta un ángulo de 45 grados (n = 1), o si la relación concentración-tiempo-respuesta es de pendiente menos pronunciada (por ejemplo, n = 2) o más pronunciada (por ejemplo, n = 0,8). En los dos últimos casos se recomienda encarecidamente adaptar en consecuencia los siguientes valores de concentración y tiempo aplicados.

▼M4

**Sesión de exposición IV — Estudio principal**

— 1 animal por sexo y por valor de concentración/tiempo; 10 animales en total.

— Se exponen cinco lotes de animales a una concentración superior ([e]) (2L) con tiempos de exposición algo más cortos (espaciado de factor √2; véase la figura 1).

**Tratamiento matemático de los resultados obtenidos con el protocolo de C × t**

11. Un estudio de C × t con 4 o 5 concentraciones y cinco períodos de exposición rendirá, respectivamente 20 o 25 puntos de datos. A partir de estos puntos de datos se puede calcular la relación C × t aplicando el análisis estadístico (16):

*Ecuación1:*

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

donde C = concentración; t = período de exposición, o

*Ecuación 2:*

$$Respuesta = f(C^n t)$$

donde $n = b_1/b_2$.

Aplicando la ecuación 1, se puede calcular el valor de $CL_{50}$ para un período dado (por ejemplo, 4 horas, 1 hora, 30 minutos o cualquier período dentro del intervalo de períodos estudiados) haciendo P = 5 (50 % de respuesta). Obsérvese que la regla de Haber solo es aplicable para n = 1. La $CL_{01}$ se puede calcular haciendo P = 2,67.

([e]) En determinados casos puede ser necesario aumentar la concentración (2L) y aplicar un cuadriculado temporal aún más denso, haciendo una división geométrica de los períodos de exposición por un factor de 1,4 (√2) en torno al tiempo que corresponde a la concentración letal mínima observada en la primera exposición. El período mínimo de exposición rebasará preferiblemente los 5 minutos; el período máximo de exposición no debe superar las 8 horas.

▼B

## B.3. TOXICIDAD AGUDA POR VÍA CUTÁNEA

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

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

#### 1.2. DEFINICIONES

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

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

#### 1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

##### 1.6.1. **Preparación**

Se mantiene a los animales en las jaulas para el experimento en las condiciones de alojamiento y alimentación adecuadas para el ensayo por lo menos durante los 5 días anteriores. Antes de comenzar el ensayo se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos y se reparten entre los diferentes lotes del ensayo. Unas 24 horas antes del ensayo se esquila o se rasura el pelo de la región dorsal del tronco de los animales, evitando cualquier lesión de la piel que pueda modificar su permeabilidad. La superficie que hay que preparar para la aplicación de la sustancia no debe ser inferior al 10 % de la superficie corporal. Cuando se sometan a ensayo sólidos, que puedan pulverizarse eventualmente, la sustancia deberá humedecerse con agua o, si es preciso, con un vehículo adecuado, para asegurar un buen contacto con la piel. Si se utiliza un vehículo, se habrá de tener en cuenta su incidencia sobre la penetración de la sustancia en la piel. Las sustancias líquidas, generalmente, se aplican sin diluir.

##### 1.6.2. **Condiciones del ensayo**

###### 1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

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

▼B

1.6.2.2. *Número y sexo*

Para cada dosis se utilizarán al menos 5 animales del mismo sexo. Si se utilizan hembras, deberán ser nulíparas y no grávidas. Cuando se disponga de información que demuestre que un sexo es mucho más sensible, se utilizarán para la prueba animales de ese sexo.

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

1.6.2.3. *Dosis*

Las dosis deben ser en número suficiente, al menos tres, y espaciadas adecuadamente para producir lotes que presenten variedad de efectos tóxicos y de mortalidad, Al elegir las dosis debe tomarse en consideración cualquier efecto irritante o corrosivo. Los resultados deben ser suficientes para que se pueda trazar una curva dosis/respuesta y, si fuera posible, permitir una determinación válida de la $DL_{50}$.

1.6.2.4. *Prueba límite*

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

1.6.2.5. *Período de observación*

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

1.6.3. **Procedimiento**

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

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

▼B

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

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

Las observaciones deben incluir las modificaciones del pelo, la piel tratada, los ojos y las mucosas, el aparato respiratorio, el sistema circulatorio, los sistemas nerviosos autónomo y central, la actividad somato-motriz y el comportamiento. Deben observarse con especial atención los temblores, las convulsiones, la salivación, las diarreas, el letargo, el sueño y el coma. El momento de la muerte debe anotarse con la mayor precisión posible. Se hará la autopsia a los animales que mueran durante el experimento y, al final del mismo, a los que hayan sobrevivido. Deben registrare todas las modificaciones patológicas macroscópicas. Si es necesario se extraerán te]idos para un examen histopatológico posterior.

*Valoración de la toxicidad en el otro sexo*

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

2. **RESULTADOS**

Los resultados deberán inventariarse en un cuadro que indique, para cada lote, el número de animales al principio del ensayo, el momento de la muerte de cada animal, el número de animales que presenten otros síntomas de toxicidad, la descripción de los efectos tóxicos y los resultados de la autopsia. El peso de cada animal debe determinarse y anotarse poco antes de la aplicación de la sustancia y, después de la misma, una vez por semana y en el momento de su muerte; deben calcularse y registrarse las variaciones de peso cuando la supervivencia del animal supere un día. Los animales que se sacrifiquen de forma humanitaria debido a angustia o dolor causados por la sustancia se registrarán como muertes debidas a la sustancia. La $DL_{50}$ debe determinarse mediante un método reconocido.

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

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

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

▼B

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.,

— condiciones de ensayo (incluido el procedimiento de limpieza de la piel y el tipo de apósito: oclusivo o no oclusivo),

— dosis (indicando las concentraciones y, en su caso, el vehículo),

— sexo de los animales utilizados,

— tabla de respuestas por sexo y por dosis (número de animales que mueren o son sacrificados durante el ensayo, número de animales con síntomas de toxicidad, número de animales expuestos),

— momento de la muerte después de administrar la dosis, motivos y criterios para el sacrificio humanitario de los animales,

— todas las observaciones,

— valor de la $DL_{50}$ para el sexo sometido a un estudio completo, determinado el decimocuarto día, indicando con precisión el método de cálculo,

— intervalo de confianza estadística del 95 % para la $DL_{50}$ (si es posible determinarlo),

— curva dosis/mortalidad y pendiente de la curva si el método de cálculo lo permite,

— resultados de la autopsia,

— observaciones histopatológicas,

— resultado de cualquier ensayo en el sexo contrario,

— discusión de los resultados (prestando especial atención al efecto que puede tener sobre la $DL_{50}$ calculada el sacrificio humanitario de animales durante el ensayo),

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

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

4. **REFERENCIAS**

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

▼**M8**

## B.4 **TOXICIDAD AGUDA: IRRITACIÓN/CORROSIÓN CUTÁNEA**

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 404 de la OCDE (2015). Las directrices de ensayo de la OCDE para los ensayos de productos se revisan periódicamente a fin de garantizar que reflejan los mejores conocimientos científicos disponibles. En la revisión de las TG 404 de la OCDE, se ha prestado atención especial a las posibles mejoras en relación con las cuestiones del bienestar de los animales y con la evaluación de toda la información existente sobre el producto problema, para no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias. La versión actualizada de las TG 404 de la OCDE (adoptadas originalmente en 1981, revisadas en 1992, 2002 y 2015) incluye una referencia al documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, Integrated Approaches to Testing and Assessment) en relación con la irritación/corrosión cutánea (1), que propone un enfoque modular para el ensayo de la irritación cutánea y de la corrosión cutánea. Los IATA describen varios módulos que agrupan las fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aportan orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) proponen un enfoque cuando se precisan más ensayos (1). Además, en caso necesario, se recomienda en dicho documento la aplicación sucesiva, y no simultánea, de los tres parches de ensayo a los animales en el ensayo *in vivo* inicial.

2. Las definiciones de irritación y corrosión cutánea se indican en el apéndice del presente método de ensayo.

### CONSIDERACIONES INICIALES

3. En aras tanto del rigor científico como del bienestar de los animales, no debe considerarse la realización de ensayos *in vivo* hasta que se hayan evaluado todos los datos disponibles relativos a la capacidad de corrosión/irritación ocular del producto problema mediante un análisis de ponderación de las pruebas, como se indica en el documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación en relación con la irritación/corrosión cutánea, a saber, en las tres partes de este documento y sus módulos correspondientes (1). En resumen, con arreglo a la parte 1, los datos disponibles se tratan a lo largo de siete módulos relativos a los datos obtenidos con seres humanos, datos *in vivo*, datos *in vitro*, datos sobre propiedades fisicoquímicas (p. ej., pH, en particular acidez o alcalinidad fuertes) y métodos no experimentales. Con arreglo a la parte 2, se realiza un análisis de ponderación de las pruebas. Si esta ponderación de las pruebas sigue sin ser concluyente, debe aplicarse la parte 3, con ensayos adicionales, empezando con métodos *in vitro* y utilizando los métodos *in vivo* solo como último recurso. Por tanto, este análisis debe reducir la necesidad de realizar ensayos *in vivo* de la corrosión/irritación cutánea de los productos problema de los que ya se disponga de pruebas suficientes obtenidas con otros estudios efectuados sobre esos dos criterios de valoración.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO IN VIVO

4. El producto problema se aplica en una sola dosis a la piel de un animal de experimentación; sirven de control las zonas sin tratar de la piel del animal de ensayo. Se observa y puntúa el grado de irritación/corrosión a intervalos determinados, y luego se describe para la completa evaluación de los efectos. La duración del estudio ha de ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos observados.

▼M8

5. Los animales que muestren signos continuados de deterioro o dolor graves en cualquier fase del ensayo deben ser sacrificados de forma compasiva, con la consiguiente evaluación del producto problema. Los criterios para tomar la decisión de sacrificar de forma compasiva los animales moribundos y que sufren intensamente son objeto de otro documento de orientación de la OCDE (2).

PREPARACIÓN DEL ENSAYO IN VIVO

**Selección de la especie animal**

6. El animal de laboratorio que se prefiere es el conejo albino; se utilizan adultos jóvenes sanos. Si se utilizan otras especies será necesario justificarlo.

**Preparación de los animales**

7. Aproximadamente 24 horas antes del ensayo se afeita el pelo apurando bien en la zona dorsal del tronco de los animales. Se ha de tener cuidado para no erosionar la piel, y solo se deben utilizar animales con piel sana e intacta.

8. Algunas razas de conejo tienen densas placas de pelo que son más prominentes en determinadas épocas del año. Dichas zonas no deben utilizarse para realizar los ensayos.

**Condiciones de alojamiento y alimentación**

9. Los animales deben alojarse de manera individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 20 °C (± 3 °C) para los conejos. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo, y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación debe ser artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

**Aplicación del producto problema**

10. El producto problema debe aplicarse a una pequeña zona de piel (de unos 6 $cm^2$), que se cubrirá con una gasa, la cual se sujetará con esparadrapo no irritante. Cuando no sea posible la aplicación directa (por ejemplo, líquidos o algunas pastas), el producto problema se aplicará primero a la gasa, que se aplicará a continuación a la piel. La gasa debe mantenerse en contacto con la piel, sin apretar, por medio de un apósito semioclusivo apropiado durante todo el período de exposición. Si se aplica el producto problema a la gasa, esta debe sujetarse a la piel de forma que el contacto sea bueno y el producto problema se distribuya de manera uniforme sobre la piel. Se evitará que el animal tenga acceso a la gasa y que pueda comerse o inhalar el producto problema.

11. Los productos problema líquidos se emplean por lo general sin diluir. En caso de que sea sólido (que se podrá pulverizar si se considera necesario), el producto problema se humedecerá con el mínimo de agua (u otro vehículo adecuado, si se considera necesario), que garantice un buen contacto con la piel. Si se utilizan vehículos distintos del agua, ha de ser mínima o nula la posible influencia del vehículo sobre la irritación cutánea debida al producto problema.

12. Finalizado el período de exposición, que normalmente es de 4 horas, se eliminarán los residuos del producto problema cuando ello sea posible, con agua o con un disolvente adecuado que no altere la respuesta producida ni la integridad de la epidermis.

▼M8

**Posología**

13. Se pondrá una dosis de 0,5 ml de líquido o de 0,5 g de sólido o pasta en el punto de aplicación.

**Ensayo inicial (ensayo de irritación/corrosión cutánea *in vivo* con un solo animal)**

14. En los casos en que un producto problema se haya considerado corrosivo, irritante o no clasificado sobre la base de análisis de ponderación de las pruebas o de ensayos previos *in vitro*, normalmente no es necesario efectuar más ensayos *in vivo*. No obstante, en los casos en que se piense que está justificado obtener datos adicionales, se realizará el ensayo *in vivo* utilizando inicialmente un solo animal y aplicando el siguiente planteamiento. Se utilizan secuencialmente hasta tres parches de ensayo con el animal. El primero se retira a los tres minutos. Si no se observa ninguna reacción cutánea grave, se utiliza un segundo parche en un lugar diferente y se retira al cabo de una hora. Si en este momento las observaciones indican que desde un punto de vista humanitario se puede aumentar la exposición hasta cuatro horas, se aplica un tercer parche que se retira al cabo de cuatro horas, y se clasifica la respuesta.

15. Si tras alguna de las tres exposiciones secuenciales se observa un efecto corrosivo, se suspende el ensayo inmediatamente. Si una vez retirado el último parche no se observa efecto corrosivo, se somete a observación al animal durante 14 días, a menos que aparezca corrosión antes.

16. En los casos en que no esté previsto que el producto problema sea corrosivo pero sí pueda ser irritante, se pondrá un solo parche a un solo animal durante cuatro horas.

**Ensayo de confirmación (ensayo de irritación cutánea *in vivo* con animales adicionales)**

17. Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo, se confirmará la respuesta irritante o negativa con un máximo de dos animales más, cada uno con un parche, durante un período de exposición de cuatro horas. Si se observa efecto irritante en el ensayo inicial, el ensayo de confirmación puede hacerse de forma secuencial, o exponiendo a otros dos animales a la vez. En el caso excepcional de que no se realice el ensayo inicial, se podrán tratar dos o tres animales con un solo parche, que se retirará al cabo de cuatro horas. Cuando se utilicen dos animales, no será necesario realizar más ensayos si ambos muestran la misma respuesta. En caso contrario, se someterá a ensayo el tercer animal. Si la respuesta es dudosa, puede ser necesario evaluarla utilizando más animales.

**Período de observación**

18. La duración del período de observación debe ser suficiente para evaluar por completo la reversibilidad de los efectos observados. No obstante, se dará por finalizado el experimento si en cualquier momento el animal presenta signos continuados de dolor o malestar intensos. Para determinar la reversibilidad de los efectos los animales serán sometidos a observación durante hasta 14 días a partir de la retirada de los parches. Si se observa la irreversibilidad antes de 14 días, el experimento debe finalizar en ese momento.

**Observaciones clínicas y graduación de las reacciones cutáneas**

19. En todos los animales se examinarán los signos de eritema y edema, puntuándose las repuestas al cabo de 60 minutos, y de 24, 48 y 72 horas de la retirada del parche. En cuanto al ensayo inicial con un solo animal, la zona de ensayo también se examina inmediatamente después de retirar el parche. Las reacciones cutáneas se clasifican y registran conforme a los grados del cuadro siguiente. Si al cabo de 72 horas hay una lesión cutánea que no se puede considerar como irritación o corrosión, quizá sea necesario observarla hasta el día 14 para determinar la reversibilidad de los efectos. Además de observar la irritación, se debe realizar una descripción completa y el registro

▼M8

de todos los efectos tóxicos locales, como la destrucción de la grasa de la piel, y de cualquier efecto adverso sistémico (por ejemplo, los efectos sobre los signos clínicos de toxicidad y el peso corporal). Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para aclarar respuestas dudosas.

20. La clasificación de las respuestas cutáneas es subjetiva necesariamente. Para armonizar tal clasificación y ayudar a los laboratorios y a quienes efectúan e interpretan las observaciones, el personal encargado de estas recibirá formación adecuada sobre el sistema de puntuación utilizado (véase el cuadro siguiente). Puede ser útil disponer de una guía ilustrada para clasificar la irritación cutánea y otras lesiones (3).

DATOS E INFORME

21. Los resultados del estudio se resumirán en tablas en el informe final y deben incluir todos los aspectos enumerados en el punto 24.

**Evaluación de los resultados**

22. Deben evaluarse las puntuaciones de la irritación cutánea, junto con la naturaleza y la gravedad de las lesiones, así como su reversibilidad o irreversibilidad. Las puntuaciones individuales no constituyen una medida absoluta de las propiedades irritativas del material, pues también se evalúan otros efectos del material problema. En cambio, las puntuaciones individuales deben considerarse como valores de referencia, que han de evaluarse en combinación con todas las demás observaciones del estudio.

23. Para evaluar las respuestas irritativas hay que tener en cuenta la reversibilidad de las lesiones cutáneas. Si se producen respuestas como alopecia (zona limitada), hiperqueratosis, hiperplasia y descamación, y persisten al final del período de observación de 14 días, se considerará que el producto problema es un irritante.

**Informe del ensayo**

24. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Justificación del ensayo in vivo:*

— Análisis de ponderación de las pruebas correspondientes a los datos de ensayos anteriores, incluidos los resultados de la estrategia de evaluación secuencial;

— Descripción de datos relevantes disponibles de ensayos realizados anteriormente;

— Datos obtenidos en cada fase de la estrategia de evaluación;

— Descripción de los ensayos *in vitro* realizados, con detalles de los procedimientos y los resultados obtenidos con las sustancias analizadas / de referencia;

— Análisis de ponderación de las pruebas para realizar el estudio *in viv*o.

*Producto problema:*

— Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;

▼**M8**

— Sustancias de componentes múltiples, mezclas y sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos (UVCB): deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el guion anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— Origen; número de lote, si está disponible;

— Tratamiento del producto problema / sustancia de control antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha para nuevo análisis, si se conoce;

— Condiciones de conservación.

*Vehículo:*

— Identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado;

— Motivación de la elección del vehículo.

*Animales de ensayo:*

— Especie/cepa utilizada, justificación del uso de animales que no sean conejos albinos;

— Número de animales de cada sexo;

— Peso de cada animal al principio y al final del ensayo;

— Edad al inicio del estudio;

— Origen de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

*Condiciones del ensayo:*

— Técnica de preparación del lugar de la aplicación del parche:

— Datos de los materiales del parche y técnica de la aplicación;

— Detalles de la preparación, aplicación y retirada del producto problema.

*Resultados:*

— Tabulación de las puntuaciones de las respuestas de irritación/corrosión de cada animal en todos los puntos temporales medidos;

— Descripciones de todas las lesiones observadas;

— Descripción narrativa de la naturaleza y grado de irritación o de corrosión observado, y eventuales observaciones histopatológicas;

— Descripción de otros efectos adversos locales (por ejemplo, destrucción de la grasa de la piel) y sistémicos, además de la irritación o corrosión cutánea.

▼**M8**

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(2) OCDE (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Noviembre de1998.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos, París.

▼**M8**

*Cuadro*

**Clasificación de las reacciones cutáneas**

**Eritema y formación de escaras**

| | |
|---|---|
| Sin eritema… | 0 |
| Eritema muy leve (apenas perceptible)… | 1 |
| Eritema bien definido… | 2 |
| Eritema de moderado a intenso… | 3 |
| Eritema intenso (enrojecimiento de color carne) o formación de escaras que impide clasificar el eritema… | 4 |

Máximo posible: 4

**Formación de edema**

| | |
|---|---|
| Sin edema… | 0 |
| Edema muy leve (apenas perceptible)… | 1 |
| Edema leve (bordes de la zona bien definidos por una elevación clara)… | 2 |
| Edema moderado (elevación de 1 mm aproximadamente)… | 3 |
| Edema intenso (se eleva más de 1 mm y se extiende más allá de la zona de exposición)… | 4 |

Máximo posible: 4

Puede realizarse un examen histopatológico para aclarar respuestas dudosas.

▼**M8**

*Apéndice*

DEFINICIONES

Producto: Sustancia o mezcla.

Irritación cutánea: Producción de una lesión reversible de la piel tras la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas.

Corrosión cutánea: Producción de una lesión irreversible de la piel; en particular, necrosis visible a través de la epidermis y en la dermis, tras la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, sangrado, costras sanguinolentas y, hacia el final del período de observación de catorce días, por decoloración debida al blanqueo de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para evaluar las lesiones dudosas.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M7

## B.5. IRRITACIÓN/CORROSIÓN OCULAR AGUDA

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 405 de la OCDE (2012). Las directrices de ensayo de la OCDE para los ensayos de productos se revisan periódicamente a fin de garantizar que reflejan los mejores conocimientos científicos disponibles. En anteriores revisiones de estas directrices de ensayo se prestaba atención especial a las posibles mejoras mediante la evaluación de toda la información existente sobre el producto problema, para no someter a los animales de laboratorio a pruebas innecesarias y responder así a la preocupación por el bienestar de los animales. Las TG 405 (adoptadas en 1981 y actualizadas en 1987, 2002, y 2012) incluyen la recomendación de que, antes de llevar a cabo el ensayo *in vivo* que se describe para la irritación/corrosión ocular aguda, hay que efectuar una ponderación de las pruebas (1) con los datos relevantes existentes. Si los datos disponibles son insuficientes, se recomienda obtenerlos mediante la aplicación de secuencias de ensayos (2) (3). La estrategia de evaluación recomendada incluye la realización de ensayos *in vitro* validados y aceptados, y se recoge como suplemento del presente método de ensayo. A efectos del Reglamento (CE) n.º 1907/2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH) ([1]), en el correspondiente documento de orientación de la ECHA (21) se incluye también una estrategia de ensayos integrada. Los ensayos con animales solo deben llevarse a cabo si se estima que resultan necesarios tras el examen de los métodos alternativos disponibles, y si se considera que su uso es adecuado. En el momento de la redacción del presente método de ensayo actualizado, hay casos en que la utilización de este método de ensayo sigue siendo necesaria u obligatoria en virtud de algunos marcos normativos.

La última actualización se centró principalmente en el uso de analgésicos y anestésicos, sin afectar al concepto de base ni a la estructura de las directrices de ensayo. El ICCVAM ([2]) y un grupo internacional e independiente de revisión científica por pares revisó la utilidad y las limitaciones de la utilización sistemática de anestésicos tópicos, de analgésicos sistémicos y de parámetros compasivos en los ensayos de irritación ocular *in vivo* (12). La revisión concluyó que el uso de anestésicos tópicos y de analgésicos sistémicos puede evitar la mayoría o la totalidad del dolor y del sufrimiento, sin afectar a los resultados del ensayo, y recomendó que estas sustancias se utilizaran siempre. El presente método de ensayo tiene en cuenta esta revisión. En los ensayos *in vivo* de irritación y corrosión ocular aguda deben utilizarse sistemáticamente anestésicos tópicos, analgésicos sistémicos y parámetros compasivos. Las eventuales excepciones habrán de justificarse. Los refinamientos que se describen en el presente método reducirán sustancialmente o evitarán el dolor y el sufrimiento de los animales en la mayoría de las situaciones en las que siga siendo necesario efectuar ensayos de seguridad ocular *in vivo*.

Un tratamiento preventivo y equilibrado del dolor debe incluir: i) un tratamiento previo sistemático con un anestésico tópico (por ejemplo, proparacaína o tetracaína) y un analgésico sistémico (por ejemplo, buprenorfina), ii) un tratamiento posterior sistemático con analgésicos sistémicos (por ejemplo, buprenorfina y meloxicam), iii) un programa de observación, seguimiento y registro de los animales en cuanto a los signos clínicos de dolor o sufrimiento, y iv) un programa de observación, seguimiento y registro de la naturaleza, gravedad y evolución de todas las lesiones oculares. Se encuentran más detalles en los procedimientos actualizados que se describen a continuación. Tras la administración

([1]) Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n.º 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. (DO L 304 de 22.11.2007, p. 1).

([2]) *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos) de Estados Unidos.

▼M7

del producto problema, no deben aplicarse más anestésicos ni analgésicos tópicos a fin de evitar interferencias con el estudio. No deben aplicarse de forma tópica analgésicos con actividad antiinflamatoria (p. ej., meloxicam), y las dosis utilizadas sistémicamente no deben interferir con los efectos oculares.

Las definiciones se recogen en el apéndice del presente método de ensayo.

CONSIDERACIONES INICIALES

En aras de una ciencia válida y del bienestar de los animales no debe considerarse la realización de ensayos *in vivo* hasta que se hayan evaluado todos los datos disponibles relativos al potencial de corrosión/irritación ocular del producto mediante la ponderación de las pruebas. Dichos datos incluyen las pruebas obtenidas en estudios previos realizados con seres humanos o con animales de laboratorio, las pruebas de corrosión/irritación ocular por una o más de sustancias relacionadas estructuralmente o por una mezcla de las mismas, los datos que demuestren una elevada acidez o alcalinidad del producto (4) (5), y los resultados obtenidos en ensayos aceptados y validados de corrosión cutánea y de corrosión/irritación ocular *in vitro* o *ex vivo* (6) (13) (14) (15) (16) (17). Los estudios pueden haber sido realizados antes de la ponderación de las pruebas, o a consecuencia de la misma.

Para ciertos productos, dicho análisis puede indicar la necesidad de realizar estudios *in vivo* del potencial de corrosión/irritación ocular del producto. En todos esos casos, antes de considerar el uso de un ensayo ocular *in vivo*, resulta preferible llevar a cabo en primer lugar un estudio *in vitro* o *in vivo* de los efectos de corrosión cutánea del producto, y evaluar este estudio de acuerdo con la estrategia de evaluación secuencial del método de ensayo B.4 (7) o la estrategia de ensayos integrada descrita en el documento de orientación de la ECHA (21).

Se adjunta como suplemento del presente método de ensayo, y, a efectos de REACH, en el documento de orientación de la ECHA (21), una estrategia de evaluación secuencial, que incluye la ejecución de ensayos validados de irritación/corrosión ocular *in vitro* o *ex vivo*. Se recomienda seguir dicha estrategia de evaluación antes de llevar a cabo ensayos *in vivo*. Con los productos nuevos se recomienda un enfoque de evaluación por fases para obtener datos científicamente válidos sobre la corrosión/irritación provocada por el producto. Con los productos existentes que cuentan con datos insuficientes sobre su corrosión/irritación cutánea y ocular, puede utilizarse también esta estrategia para obtener los datos que falten. Deben justificarse los casos en que se emplee una estrategia o procedimiento de evaluación diferente, o en que se decida no utilizar un enfoque de evaluación por fases.

PRINCIPIO DEL ENSAYO *IN VIVO*

Después de un tratamiento previo con analgésicos sistémicos y la inducción de una anestesia tópica adecuada, el producto problema se aplica en una sola dosis a uno de los ojos del animal de experimentación; el ojo sin tratar sirve de testigo. Se evalúa el grado de irritación/corrosión ocular a intervalos determinados, asignando una puntuación a las lesiones de la conjuntiva, la córnea y el iris. También se describen otros efectos en el ojo y los efectos sistémicos adversos, para proporcionar una evaluación completa de los efectos. La duración del estudio ha de ser suficiente para evaluar la reversibilidad o irreversibilidad de los efectos observados.

Los animales que presenten signos de sufrimiento o dolor graves en cualquier fase del ensayo o lesiones compatibles con los parámetros compasivos descritos en el presente método de ensayo (véase el punto 26) deben ser sacrificados de forma compasiva, y el producto evaluado en consecuencia. Los criterios para tomar la decisión de sacrificar de forma compasiva los animales moribundos y que sufren intensamente son objeto de un documento de orientación de la OCDE (8).

▼M7

PREPARACIÓN DEL ENSAYO *IN VIVO*

**Selección de las especies**

El conejo albino es el animal de laboratorio preferido; se emplean individuos adultos jóvenes y sanos. Si se utilizan otras especies será necesario justificarlo.

**Preparación de los animales**

En las 24 horas previas al inicio del ensayo se examinarán los dos ojos de los animales de experimentación provisionalmente seleccionados para el ensayo. No se utilizarán animales que muestren irritación ocular, defectos oculares o lesión corneal preexistente.

**Alojamiento y alimentación**

Los animales deben ser alojados de manera individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 20 °C (± 3 °C) en el caso de los conejos. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación debe ser artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Debe evitarse una excesiva intensidad de la luz. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

**Uso de anestésicos tópicos y analgésicos sistémicos**

Se recomiendan los siguientes procedimientos para evitar o reducir al mínimo el dolor y el sufrimiento en los ensayos de seguridad ocular. Pueden utilizarse otros procedimientos de los que se haya establecido que evitan o alivian de forma igual o mejor el dolor y el sufrimiento.

— Sesenta minutos antes de la aplicación del producto problema (APP), se administran 0,01 mg/kg de buprenorfina por inyección subcutánea (SC) para proporcionar un nivel terapéutico de analgesia sistémica. No se sabe ni se espera que la buprenorfina y otros analgésicos opiáceos similares administrados de forma sistémica alteren las respuestas oculares (12).

— Cinco minutos antes de la APP, se aplican a cada ojo una o dos gotas de anestésico ocular tópico (por ejemplo, clorhidrato de proparacaína al 0,5 % o clorhidrato de tetracaína al 0,5 %). Para evitar posibles interferencias con el estudio, se recomienda que el anestésico tópico no contenga conservantes. El ojo de cada animal que no se trata con el producto problema, pero sí con el anestésico tópico, sirve de testigo. Si se prevé que el producto problema puede causar dolor y sufrimiento significativos, en principio no debe someterse a ensayos *in vivo*. No obstante, en caso de duda o cuando sea necesario efectuar estos ensayos, debe considerarse la aplicación adicional del anestésico tópico a intervalos de 5 minutos antes de la APP. Los usuarios deben ser conscientes de que la repetición de la aplicación de anestésico tópico puede provocar un ligero aumento de la gravedad de las lesiones causadas químicamente o del tiempo necesario para recuperarse de tales lesiones.

— Ocho horas después de la APP se administran 0,01 mg/kg de buprenorfina y 0,5 mg/kg de meloxicam SC para conseguir un nivel terapéutico continuo de analgesia sistémica. Aunque no hay datos que sugieran que el meloxicam tiene efectos antiinflamatorios en los ojos si se administra una vez al día por vía subcutánea, no debe administrarse esta sustancia hasta que hayan pasado al menos 8 horas desde la APP, a fin de evitar cualquier posible interferencia con el estudio (12).

— Después del tratamiento inicial a las 8 horas de la APP, deben administrarse 0,01 mg/kg de buprenorfina SC cada 12 horas, además de 0,5 mg/kg de meloxicam SC cada 24 horas, hasta que desaparezcan las lesiones oculares y no haya signos clínicos de dolor y sufrimiento. Se dispone de preparados

▼M7

de analgésicos de liberación prolongada, con las que puede contarse para disminuir la frecuencia de la administración de analgésicos.

— Debe darse una analgesia de «socorro» inmediatamente tras la APP si la analgesia preventiva y la anestesia local son inadecuadas. A los animales que muestren signos de dolor y sufrimiento durante el estudio se les debe administrar inmediatamente una dosis de «socorro» de 0,03 mg/kg de buprenorfina SC, que se repetirá cada 8 horas, en caso necesario, en lugar de 0,01 mg/kg SC cada 12 horas. Se administran 0,5 mg/kg de meloxicam SC cada 24 horas además de la dosis de «socorro» de buprenorfina, pero no hasta que hayan pasado al menos 8 horas tras la APP.

**Aplicación del producto problema**

El producto problema debe aplicarse a la conjuntiva de un ojo de cada animal, tras separar suavemente el párpado inferior del globo ocular. A continuación se juntan con suavidad los párpados durante un segundo aproximadamente, para que no se pierda el material. El otro ojo no se trata y sirve de testigo.

**Lavado**

No se lavarán los ojos de los animales tratados hasta al menos 24 horas después de la instilación del producto problema, excepto en el caso de sólidos (véase el punto 18) y si se producen efectos corrosivos o irritantes inmediatos. Transcurridas 24 horas se podrán lavar los ojos si se considera necesario.

No se recomienda utilizar un grupo satélite de animales para investigar la influencia del lavado, a menos que esté justificado desde el punto de vista científico. Si se necesita un grupo satélite, estará formado por dos conejos. Las condiciones del lavado deben quedar minuciosamente documentadas como, por ejemplo, hora del lavado, composición y temperatura de la solución de lavado, duración, volumen y velocidad de la aplicación.

**Posología**

1) *Ensayo de líquidos*

Para el ensayo de líquidos se emplea una dosis de 0,1 ml. No se deben utilizar bombas de aerosol para instilar el producto directamente en el ojo. El aerosol líquido se expulsa de la bomba y se recoge en un recipiente, antes de instilar 0,1 ml en el ojo.

2) *Ensayo de sólidos*

Para el ensayo de sólidos, pastas y productos con partículas, la cantidad utilizada debe tener un volumen de 0,1 ml o no pesar más de 100 mg. El material problema debe estar reducido a polvo fino. El volumen de material sólido se medirá tras compactarlo con suavidad, por ejemplo golpeando suavemente con los dedos el envase medidor. Si en el primer punto temporal de observación (1 hora después de la aplicación) el producto problema sólido no ha sido eliminado del ojo del animal de ensayo por mecanismos fisiológicos, se puede lavar el ojo con suero salino o con agua destilada.

3) *Evaluación de aerosoles*

Se recomienda recoger en un recipiente el contenido de todas las bombas de aerosol antes de instilarlo en el ojo. La única excepción son los productos que van en envases de aerosol presurizados y que no se pueden recoger debido a la vaporización. En esos casos hay que sujetar el ojo bien abierto, administrando el producto problema en el ojo con una sola pulverización de alrededor de un segundo, a una distancia de 10 cm directamente delante del ojo. Esta distancia puede variar dependiendo de la presión del aerosol y de su contenido. Hay que tener cuidado para no lesionar el ojo con la presión del aerosol. En determinados casos puede ser necesario evaluar el potencial de causar una lesión «mecánica» del ojo por la fuerza del aerosol.

▼M7

Es posible calcular la dosis de un aerosol, simulando el ensayo como se indica a continuación: se pulveriza el producto sobre papel de pesar, a través de una abertura del tamaño del ojo de un conejo, colocada directamente delante del papel. El aumento de peso del papel sirve para calcular aproximadamente la cantidad administrada al ojo. En el caso de los productos volátiles se puede calcular la dosis pesando un envase receptor antes y después de retirar el producto problema.

**Ensayo inicial (ensayo de irritación/corrosión ocular *in vivo* con un solo animal)**

Se recomienda encarecidamente realizar el ensayo *in vivo* inicialmente con un solo animal (véase el suplemento del presente método de ensayo: Estrategia de evaluación secuencial de la irritación y la corrosión oculares). Las observaciones deben permitir determinar la gravedad y la reversibilidad antes de proceder a un ensayo de confirmación con un segundo animal.

Si los resultados de este ensayo indican que el producto es irritante intenso o corrosivo en el ojo siguiendo el procedimiento descrito, no se harán más ensayos de irritación ocular.

**Ensayo de confirmación (ensayo de irritación ocular *in vivo* con animales adicionales)**

Si en el ensayo inicial no se observa efecto corrosivo o irritante intenso, la respuesta irritante o negativa debe confirmarse con un máximo de dos animales más. Si se observa efecto irritante en el ensayo inicial, se recomienda efectuar el ensayo de confirmación de forma secuencial exponiendo a los animales de uno en uno, en lugar de exponer a los dos animales adicionales a la vez. Si el segundo animal presenta efectos corrosivos o irritantes intensos se suspenderá el ensayo. Si los resultados del segundo animal son suficientes para permitir una clasificación de peligro, no deben hacerse más ensayos.

**Período de observación**

La duración del período de observación debe ser suficiente para evaluar por completo la magnitud y reversibilidad de los efectos observados. No obstante, se dará por finalizado el experimento si en cualquier momento el animal presenta signos de dolor o sufrimiento intensos (8). Para determinar la reversibilidad de los efectos, lo normal es someter a los animales a 21 días de observación a partir de la administración del producto problema. Si se observa la irreversibilidad antes de 21 días, el experimento debe finalizar en ese momento.

**Observaciones clínicas y graduación de las reacciones oculares**

Los ojos deben ser objeto de una evaluación exhaustiva en cuanto a la presencia o ausencia de lesiones oculares cuando haya pasado una hora de la APP, seguida de evaluaciones al menos diarias. Los animales deben ser evaluados varias veces al día durante los primeros 3 días para asegurarse de que las decisiones de finalización se adoptan en el momento oportuno. Los animales de ensayo deben ser objeto de evaluación sistemática a lo largo de toda la duración del estudio en cuanto a la presencia de signos clínicos de dolor o sufrimiento (por ejemplo, frotamiento repetido del ojo, parpadeo o lagrimeo excesivo) (9) (10) (11), al menos dos veces al día, con un mínimo de 6 horas entre las observaciones, o con mayor frecuencia si es necesario. Esto es necesario para: i) evaluar adecuadamente los animales en cuanto a la presencia de signos de dolor y sufrimiento a fin de tomar decisiones con conocimiento de causa sobre la necesidad de aumentar la dosis de analgésicos, y ii) evaluar los animales en cuanto a la presencia de parámetros compasivos establecidos a fin de tomar decisiones con conocimiento de causa sobre si procede realizar el sacrificio de los animales de forma compasiva, y garantizar que tales decisiones se tomen de manera oportuna. Se debe utilizar la tinción de fluoresceína sistemáticamente y un biomicroscopio de lámpara de hendidura cuando se considere oportuno (por ejemplo, para evaluar la

▼M7

profundidad de la lesión en caso de úlcera de la córnea) como ayuda en la detección y medición de daños oculares, y para evaluar si se han cumplido los criterios de parámetros establecidos para el sacrificio compasivo. Pueden tomarse fotografías digitales de las lesiones observadas para que sirvan de referencia y proporcionen un registro permanente de la importancia de los daños oculares. Los animales no permanecerán en el ensayo más tiempo del necesario, una vez obtenida la información definitiva. Los animales que muestren dolor o sufrimiento intenso deben ser sacrificados inmediatamente de forma compasiva, y el producto evaluado en consecuencia.

Los animales que presenten las siguientes lesiones oculares después de la instilación deben ser sacrificados de forma compasiva (véase en el cuadro 1 una descripción de los grados de las lesiones): perforación de la córnea o ulceración importante de la córnea, incluido el estafiloma; presencia de sangre en la cámara anterior del ojo; opacidad corneal de grado 4; ausencia de reflejo fotomotor (respuesta del iris de grado 2) que persista durante 72 horas; ulceración de la conjuntiva; necrosis de la conjuntiva o de la membrana nictitante, o pérdida de epitelio. Esto se debe a que tales lesiones no suelen ser reversibles. Además, se recomienda que las siguientes lesiones oculares se utilicen como parámetros compasivos para finalizar los estudios antes de que termine el período de observación de 21 días. Se considera que estas lesiones predicen la aparición de lesiones irritantes intensas o corrosivas y de lesiones de las que no se espera que reviertan plenamente al final del período de observación de 21 días: lesión de profundidad importante (por ejemplo, úlcera de la córnea que se extiende más allá de las capas superficiales del estroma), destrucción del limbo > 50 % (puesta de manifiesto por la palidez conjuntival), e infección ocular grave (supuración). Una combinación de vascularización de la superficie de la córnea (es decir, queratitis vascular), mantenimiento de la superficie teñida con fluoresceína a lo largo del tiempo según una evaluación diaria y/o ausencia de nueva epitelización 5 días después de la aplicación del producto problema también podría considerarse como un criterio potencialmente útil para influir en la decisión clínica sobre la finalización precoz del estudio. No obstante, estas observaciones aisladas son insuficientes para justificar la finalización precoz del estudio. Una vez que se han detectado efectos oculares graves, debe pedirse a un veterinario especialista o experto en animales de laboratorio o a una persona con una formación adecuada para identificar lesiones clínicas que realice un examen clínico para determinar si la combinación de tales efectos justifica la finalización precoz del estudio. Deben obtenerse y registrarse los grados de reacción ocular (conjuntiva, córnea e iris) cuando han pasado 1, 24, 48 y 72 horas desde la aplicación del producto problema (cuadro 1). Los animales que no presenten lesiones oculares deben permanecer en observación al menos 3 días después de la instilación. Los animales con lesiones que no sean graves deben permanecer en observación hasta que desaparezcan las lesiones o hasta que transcurran 21 días, momento en que finaliza el estudio. Deben efectuarse y registrarse observaciones al menos cuando hayan pasado 1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 7 días, 14 días y 21 días, para determinar el estado de las lesiones y si son o no reversibles. Deben efectuarse observaciones más frecuentes cuando sea necesario para determinar si el animal de experimentación ha de sacrificarse por motivos compasivos o eliminarse del estudio debido a los resultados negativos.

Deben registrarse en cada examen los grados de las lesiones oculares (cuadro 1). También deben consignarse las demás lesiones oculares (por ejemplo, queratitis vascular, manchas, cambios en la cámara anterior) o efectos sistémicos adversos eventuales.

Se puede facilitar el examen de las reacciones mediante el uso de una lupa binocular, de una lámpara de hendidura manual, de un biomicroscopio o de otro dispositivo adecuado. Tras registrar las observaciones a las 24 horas, las ulteriores exploraciones del ojo pueden hacerse con la ayuda de fluoresceína.

La graduación de las respuestas oculares es subjetiva necesariamente. Para armonizar tal graduación y ayudar a los laboratorios y a quienes efectúan e interpretan las observaciones, el personal encargado recibirá formación adecuada sobre el sistema de puntuación utilizado.

▼M7

DATOS E INFORME

**Evaluación de los resultados**

Deben evaluarse las puntuaciones de la irritación ocular, junto con la naturaleza y la gravedad de las lesiones, así como su reversibilidad o irreversibilidad. Las puntuaciones individuales no dan el nivel absoluto de las propiedades irritantes de un producto, ya que también se evalúan otros efectos del producto problema; más bien deben considerarse como valores de referencia, que solo serán significativos cuando sean respaldados por una descripción completa y la evaluación de todas las demás observaciones.

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Justificación del ensayo in vivo: análisis de la ponderación de las pruebas correspondientes a los datos de ensayos anteriores, incluidos los resultados de la estrategia de evaluación secuencial:*

— descripción de datos relevantes de ensayos realizados anteriormente,

— datos obtenidos en cada fase de la estrategia de evaluación,

— descripción de los ensayos *in vitro* realizados, con detalles de los procedimientos y de los resultados obtenidos con los productos problema/ de referencia,

— descripción del estudio sobre irritación/corrosión cutánea *in vivo* realizado, con los resultados obtenidos,

— análisis de la ponderación de las pruebas para realizar el estudio *in vivo*.

*Producto problema:*

— datos de identidad (por ejemplo, nombre químico y número CAS, si se dispone del mismo, pureza, impurezas conocidas, origen, número de lote),

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, pH, volatilidad, solubilidad, estabilidad, reactividad con el agua),

— en el caso de una mezcla, deben identificarse los componentes, con los datos de identidad de las sustancias constituyentes (por ejemplo, nombres químicos y números CAS, si se dispone de ellos) y sus concentraciones,

— dosis aplicada.

*Vehículo:*

— identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado,

— motivación de la elección del vehículo.

*Animales de ensayo:*

— especie/cepa utilizada, justificación del uso de animales que no sean conejos albinos,

— edad de cada animal al principio del estudio,

— número de animales de cada sexo en los grupos de prueba y testigo (en su caso),

— peso de cada animal al principio y al final del ensayo,

— origen de los animales, condiciones del alojamiento, dieta, etc.

▼M7

*Anestésicos y analgésicos*

— dosis y momentos de administración de los anestésicos tópicos y analgésicos sistémicos que se hayan utilizado,

— si se utiliza anestésico local, identidad, pureza, tipo, y posible interacción con el producto problema.

*Resultados:*

— descripción del método utilizado para puntuar la irritación en cada momento de observación (por ejemplo, lámpara de hendidura manual, biomicroscopio, fluoresceína),

— tabulación de los datos de respuesta irritante/corrosiva de cada animal en cada momento de observación, hasta la retirada de cada animal del ensayo,

— descripción narrativa del grado y la naturaleza de la irritación o la corrosión observadas,

— descripción de otras lesiones que se observen en el ojo (por ejemplo, vascularización, queratitis vascular, adherencias, manchas),

— descripción de los efectos adversos locales no oculares y sistémicos, registro de signos clínicos de dolor y sufrimiento, fotografías digitales, y observaciones histopatológicas, en su caso.

*Discusión de los resultados.*

**Interpretación de los resultados**

La extrapolación a seres humanos de los resultados de los estudios de irritación ocular realizados con animales de laboratorio solo es válida en cierto grado. En muchos casos, los conejos albinos son más sensibles a los irritantes o corrosivos oculares que los seres humanos.

Hay que interpretar con cuidado los datos para excluir la irritación resultante de una infección secundaria.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Barratt, M.D., *et al.* (1995), The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard, ECVAM Workshop Report 8, ATLA 23, 410 — 429.

(2) de Silva, O., *et al.* (1997), Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies, Food Chem. Toxicol 35, 159 — 164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999), A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161-177.

(4) Young, J.R., *et al.* (1988), Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals, Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 — 26.

(5) Neun, D.J. (1993), Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH, J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 — 231.

(6) Fentem, J.H., *et al.* (1998), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team, Toxicology *in vitro* 12, pp.483 — 524.

(7) Capítulo B.4 del presente anexo, *Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea*.

▼**M7**

(8) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 19. (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) Wright EM, Marcella KL, Woodson JF. (1985), Animal pain: evaluation and control, Lab Animal, May/June, 20-36.

(10) National Research Council (NRC) (2008), Recognition and Alleviation of Distress in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(11) National Research Council (NRC) (2009), Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals, Washington, DC: The National Academies Press.

(12) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report: Recommendations for Routine Use of Topical Anesthetics, Systemic Analgesics, and Humane Endpoints to Avoid or Minimize Pain and Distress in Ocular Safety Testing, NIH Publication No. 10-7514, Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences.

http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/OcuAnest- TMER.htm

(13) Capítulo B.40 del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: *ensayo de resistencia eléctrica transcutánea*.

(14) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: *ensayo con modelo de piel humana*.

(15) OCDE (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

(16) Capítulo B.47 del presente anexo, Método de ensayo de la opacidad y permeabilidad de la córnea de bovino para identificar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves.

(17) Capítulo B.48 del presente anexo, Método de ensayo de ojo de pollo aislado para identificar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves

(18) U.S. EPA (2003), Label Review Manual: 3rd Edition, EPA737-B-96-001, Washington, DC: U.S., Environmental Protection Agency.

(19) Naciones Unidas (2011), Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA), Cuarta edición revisada, Nueva York y Ginebra: Publicaciones de las Naciones Unidas.

(20) CE (2008), Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (Diario Oficial de la Unión Europea L 353, p. 1).

(21) Documento de orientación de la ECHA: Guidance on information requirements and chemical safety assessment, Chapter R.7a: Endpoint specific guidance.

http://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r7a_en.pdf

▼M7

*Cuadro 1:*

**Graduación de las lesiones oculares**

| Córnea | Grado |
|---|---|
| Opacidad: grado de densidad (la lectura se efectuará en la zona más densa) (*) | |
| Sin ulceración ni opacidad | 0 |
| Zonas de opacidad diseminadas o difusas (aparte de un empañado leve del brillo normal); los detalles del iris están claramente visibles | 1 |
| Zona translúcida fácilmente discernible; los detalles del iris están ligeramente oscurecidos. | 2 |
| Zona nacarada; no se ven los detalles del iris; el tamaño de la pupila es apenas discernible. | 3 |
| Córnea opaca; no se distingue el iris por la opacidad | 4 |
| Máximo posible: 4 | |
| Iris | |
| Normal | 0 |
| Pliegues notablemente hundidos, congestión, inflamación, moderada hiperemia o congestión pericorneal; iris reactivo a la luz (la reacción débil se considera efecto) | 1 |
| Hemorragia, destrucción clara o ausencia de reacción a la luz | 2 |
| Máximo posible: 2 | |
| Conjuntiva | |
| Enrojecimiento (se refiere a la conjuntiva palpebral y bulbar; con exclusión de la córnea y el iris) | |
| Normal | 0 |
| Algunos vasos sanguíneos hiperémicos (congestionados) | 1 |
| Coloración carmesí difusa; vasos sanguíneos difícilmente distinguibles | 2 |
| Coloración difusa roja carne de vacuno | 3 |
| Máximo posible: 3 | |
| Quemosis | |
| Inflamación (se refiere a los párpados o a las membranas nictitantes) | |
| Normal | 0 |
| Cierta hinchazón por encima de lo normal | 1 |
| Hinchazón evidente, con eversión parcial de los párpados | 2 |
| Hinchazón con párpados medio cerrados | 3 |
| Hinchazón con párpados más que medio cerrados | 4 |
| Máximo posible: 4 | |

(*) Hay que tomar nota de la superficie de la opacidad de la córnea.

▼**M7**

*Apéndice*

DEFINICIONES

**Reserva ácida/alcalina**: En el caso de las preparaciones ácidas, es la cantidad (g) de hidróxido de sodio /100 g de preparación que se necesita para obtener un pH determinado. En el caso de las preparaciones alcalinas, es la cantidad (g) de hidróxido de sodio equivalente a la cantidad (g) de ácido sulfúrico /100 g de preparación que se necesita para obtener un pH determinado (Young *et al*. 1988). 1988.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Productos no irritantes**: Sustancias que no están clasificadas como irritantes oculares de la categoría I, II o III de la EPA; ni como irritantes oculares de la categoría 1, 2, 2A o 2B del SGA; ni de la categoría 1 o 2 de la UE (17) (18) (19).

**Productos corrosivos oculares**: a) Productos que provocan una lesión irreversible de los tejidos oculares; b) productos clasificados como irritantes oculares de la categoría 1 del SGA, o de la categoría I de la EPA, o de la categoría 1 de la UE (17) (18) (19).

**Agentes irritantes para los ojos**: a) Productos que producen un cambio reversible en el ojo; b) productos que están clasificados como irritantes oculares de la categoría II o III de la EPA; o como irritantes oculares de la categoría 2, 2A o 2B del SGA; o de la categoría 2 de la UE (17) (18) (19).

**Productos irritantes intensos oculares**: a) Productos que provocan en los ojos lesiones tisulares que no se resuelven en los 21 días siguientes a la aplicación, o que provocan una degradación física severa de la vista; b) productos clasificados como irritantes oculares de la categoría 1 del SGA, o de la categoría I de la EPA, o de la categoría 1 de la UE (17) (18) (19).

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Procedimiento escalonado**: Estrategia de ensayo por fases, en la que se revisa toda la información existente sobre un producto problema, siguiendo un orden especificado, en un proceso de ponderación de las pruebas en cada escalón, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar al escalón siguiente. Si puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, no hace falta efectuar más ensayos. Si no puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, se aplica un procedimiento secuencial de ensayos con animales por fases hasta que pueda efectuarse una clasificación inequívoca.

**Ponderación de las pruebas (proceso)**: Los puntos fuertes y débiles de la información recopilada se utilizan como base para alcanzar una conclusión que puede no deducirse directamente de los datos individuales.

▼M7

## SUPLEMENTO DEL MÉTODO DE ENSAYO B.5 ([1])

ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN SECUENCIAL DE LA IRRITACIÓN Y LA CORROSIÓN OCULARES

**Consideraciones generales**

Es importante evitar el uso innecesario de animales y reducir al mínimo los ensayos que con toda probabilidad producen respuestas graves en los animales, por su bienestar y por motivos científicos. Antes de considerar la realización de ensayos *in vivo* hay que evaluar toda la información sobre un producto en lo que respeta a su posible poder corrosivo/irritante ocular. Puede que existan pruebas suficientes para clasificar el potencial corrosivo o irritante ocular de un producto problema, sin necesidad de realizar ensayos con animales de laboratorio. Por eso el uso de la ponderación de las pruebas y de una estrategia de evaluación secuencial reducirá al mínimo la necesidad de realizar ensayos *in vivo*, especialmente si es probable que el producto produzca reacciones graves.

Se recomienda utilizar la ponderación de las pruebas para evaluar la información existente sobre el potencial de irritación y corrosión oculares de los productos, para determinar si la realización de estudios adicionales, aparte de los oculares *in vivo*, ayudaría a caracterizar dicho potencial. Cuando sean necesarios otros estudios, se recomienda utilizar la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos experimentales relevantes. Para sustancias no evaluadas anteriormente, se utilizará la estrategia de evaluación secuencial para obtener los datos necesarios a fin de evaluar su potencial corrosivo/irritante ocular. La estrategia de evaluación inicial que se describe en el prresente suplemento fue redactada en un taller de la OCDE (1). Posteriormente fue confirmada y ampliada por el sistema armonizado integrado de clasificación de peligros para la salud humana y efectos ambientales de los productos químicas (Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances), y fue aprobada en la XXVIII reunión del Comité Conjunto para productos químicos (Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals) en noviembre de 1998 (2) y actualizada por un grupo de expertos de la OCDE en 2011.

Aunque la presente estrategia de evaluación no forma parte integrante del método de evaluación B.5, sí expresa el enfoque recomendado para la determinación de las características de irritación/corrosión oculares. Este enfoque representa la práctica óptima y una referencia desde el punto de vista ético para el análisis *in vivo* de la irritación/corrosión oculares. El método de ensayo proporciona instrucciones para la realización del ensayo *in vivo*, y resume los factores que se han de abordar antes de ponerlo en marcha. La estrategia proporciona un enfoque basado en la ponderación de las pruebas para la evaluación de los datos existentes sobre las propiedades de irritación/corrosión oculares de los productos problema, y un enfoque escalonado para generar datos relevantes sobre productos que necesitan estudios adicionales o que no han sido estudiadas. La estrategia incluye la realización en primer lugar de ensayos *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados, y luego de estudios según el método de ensayo B.4 en condiciones concretas (3) (4).

**Descripción de la estrategia de evaluación por fases**

Antes de llevar a cabo los ensayos que forman parte de la estrategia de evaluación secuencial (véase la figura), se evaluará toda la información disponible, para determinar la necesidad de practicar estudios oculares *in vivo*. Aunque se puede obtener información significativa a partir de la evaluación de parámetros aislados (por ejemplo, un pH extremo), hay que considerar la totalidad de la información existente. Se evaluarán todos los datos relevantes sobre los efectos del producto en cuestión y de sus análogos estructurales, para tomar una decisión basada en la

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

ponderación de las pruebas, y se presentará la justificación de dicha decisión. Se hará especial hincapié en los datos existentes sobre el producto obtenidos con seres humanos y animales, seguido por el resultado de los ensayos *in vitro* o *ex vivo*. Siempre que sea posible se evitará realizar estudios *in vivo* con productos corrosivos. Los factores que se tienen en cuenta en la estrategia de evaluación son:

Evaluación de los datos disponibles obtenidos con hombres y animales o *in vitro* mediante métodos validados y aceptados internacionalmente (fase 1).

En primer lugar se tendrán en cuenta los datos existentes obtenidos con seres humanos mediante, por ejemplo, estudios clínicos u ocupacionales e informes de casos, y los datos de ensayos de irritación/corrosión ocular realizados con animales en estudios oculares o *in vitro*, mediante métodos validados y aceptados internacionalmente, pues proporcionan información directamente relacionada con los efectos producidos en los ojos. Posteriormente deben evaluarse los datos disponibles de estudios realizados con seres humanos o animales para investigar la corrosión/irritación cutánea, y de estudios *in vitro* de corrosión cutánea según métodos validados y aceptados internacionalmente. Los productos conocidos por ser corrosivos o intensamente irritantes para el ojo no deben aplicarse a los ojos de los animales, y tampoco los productos que muestren efectos corrosivos o intensamente irritantes en la piel; estos productos deben considerarse también corrosivos o irritantes para los ojos. Cuando en estudios oculares realizados anteriormente se hayan obtenido pruebas suficientes de que un producto no es corrosivo ni irritante, este tampoco se someterá a estudios oculares *in vivo*.

Análisis de las relaciones estructura-actividad (SAR) (fase 2).

Hay que tener en cuenta los resultados de los análisis de productos relacionados desde el punto de vista estructural, si es que existen. Cuando se disponga de suficientes datos obtenidos con seres humanos o animales sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de dichas sustancias que indiquen su potencial corrosivo/irritante ocular, se puede presuponer que el producto problema producirá las mismas respuestas. En estos casos puede que no sea necesario someter a ensayo este producto. Los datos negativos de los estudios sobre sustancias relacionadas desde el punto de vista estructural o sobre mezclas de estas no constituyen demostración suficiente de que un producto no será corrosivo ni irritante en la estrategia de evaluación secuencial. Para identificar el potencial de corrosión e irritación cutánea y ocular hay que utilizar enfoques SAR validados y aceptados.

Propiedades fisicoquímicas y reactividad química (fase 3).

Los productos con pH extremos, como $\leq$ 2,0 y $\geq$ 11,5 pueden tener potentes efectos locales. Si el pH extremo es la base para identificar un producto como corrosivo o irritante para el ojo, entonces también se podrá tener en cuenta la reserva ácida/alcalina (capacidad amortiguadora) (5)(6)(7). Si la capacidad amortiguadora sugiere la posibilidad de que un producto no sea corrosivo para el ojo (es decir, productos con pH extremo y baja reserva ácida/alcalina), entonces tendrán que hacerse más ensayos para confirmarlo, de preferencia utilizando un ensayo *in vitro* o *ex vivo* validado y aceptado (véase el punto 10).

Consideración de otras informaciones existentes (fase 4).

En esta fase se evaluará toda la información disponible sobre la toxicidad sistémica por vía cutánea. También se tendrá en cuenta la toxicidad cutánea aguda del producto problema. Si se ha demostrado que el producto es muy tóxico por vía cutánea puede no ser necesario estudiarla en el ojo. Aunque no existe necesariamente relación entre la toxicidad cutánea aguda y la irritación/corrosión ocular,

▼**M7**

se puede suponer que si un agente es muy tóxico por vía cutánea también lo será si se aplica al ojo. Estos datos también se pueden tener en cuenta entre las fases 2 y 3.

Evaluación de la corrosividad cutánea del producto si es también necesaria a efectos reglamentarios (fase 5).

El potencial de corrosión e irritación intensa cutánea debe evaluarse en primer lugar de conformidad con el método de ensayo B.4 (4) y el suplemento que lo acompaña (8), incluido el uso de métodos de ensayo *in vitro* de corrosión cutánea validados y aceptados internacionalmente (9) (10) (11). Si se demuestra que el producto produce corrosión o irritación cutánea intensa, también puede considerarse corrosiva o intensamente irritante para los ojos. Por tanto, no se requerirán más ensayos. Si el producto no es corrosivo ni intensamente irritante para la piel, se realizará un ensayo ocular *in vitro* o *ex vivo*.

Resultados de los ensayos *in vitro* o *ex vivo* (fase 6).

Cuando se hayan demostrado las propiedades corrosivas o irritantes intensas de un producto en un ensayo *in vitro* o *ex vivo* (12) (13) validado y aceptado internacionalmente para la evaluación específica de la corrosión/irritación ocular, no será necesario evaluar este producto con animales. Se puede dar por supuesto que dicho producto producirá similares efectos intensos *in vivo*. Si no se dispone de ensayos *in vitro / ex vivo* validados y aceptados, debe prescindirse de la fase 6 y pasar directamente a la fase 7.

Ensayo *in vivo* con conejos (fases 7 y 8).

Los ensayos oculares *in vivo* deben empezar con un ensayo inicial con un solo animal. Si los resultados de este indican que el producto es corrosivo o intensamente irritante para el ojo, no se harán más ensayos. Si dicho ensayo no muestra efectos corrosivos ni irritantes intensos, se llevará a cabo un ensayo de confirmación con otros dos animales. En función de los resultados de la prueba de confirmación, podrá ser necesario efectuar exámenes adicionales (véase el método de ensayo B.5].

▼M7

**ESTRATEGIA DE EVALUACIÓN DE LA IRRITACIÓN/CORROSIÓN OCULAR**

| | Actividad | Constatación | Conclusión |
|---|---|---|---|
| 1 | Datos disponibles obtenidos con hombres o animales, o *in vitro* mediante métodos validados y aceptados internacionalmente que indican efectos en los ojos | Lesión grave de los ojos | Parámetro final; se considera corrosivo para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | | Irritante para los ojos | Parámetro final; se considera corrosivo para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | | No corrosivo/no irritante para los ojos | Parámetro final; se considera que no es corrosivo ni irritante para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | Datos disponibles obtenidos con hombres o animales, o *in vitro* mediante métodos validados y aceptados internacionalmente que indican efectos corrosivos en la piel | Corrosivo para la piel | Se supone que es corrosivo para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | Datos disponibles obtenidos con hombres o animales, o *in vitro* mediante métodos validados y aceptados internacionalmente que indican efectos irritantes intensos en la piel | Irritante intenso para la piel | Se supone que es irritante para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | ↓ | | |
| | *No se dispone de información, o la información disponible no es concluyente* | | |
| | ↓ | | |
| 2 | Evaluación de las relaciones estructura-actividad en cuanto a la corrosión/irritación ocular | Predice lesión grave para los ojos | Se supone que es corrosivo para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | | Predice irritación para los ojos | Se supone que es irritante para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | Consideración de las relaciones estructura-actividad en cuanto a la corrosión cutánea | Predice corrosión cutánea | Se supone que es corrosivo para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | ↓ | | |
| | *No es posible hacer predicciones, o las predicciones son negativas o no concluyentes* | | |
| | ↓ | | |
| 3 | Medición del pH (capacidad amortiguadora, si es relevante) | pH $\leq$ 2 o $\geq$ 11,5 (con elevada capacidad amortiguadora, si es relevante) | Se supone que es corrosivo para los ojos. No es necesario hacer ensayos. |
| | ↓ | | |
| | *2 < pH < 11,5 o pH ≤ 2,0 o ≥11,5 con capacidad amortiguadora baja o nula, si es relevante* | | |
| | ↓ | | |
| 4 | Consideración de los datos disponibles de toxicidad sistémica por vía cutánea | Muy tóxico a las concentraciones que se evaluarían en el ojo | El producto sería demasiado tóxico para evaluarlo. No es necesario hacer ensayos. |

▼M7

| | Actividad | Constatación | Conclusión |
|---|---|---|---|
| | ↓ | | |
| | *No se dispone de tal información, o el producto no es muy tóxico* | | |
| | ↓ | | |
| **5** | Evaluar experimentalmente el potencial de corrosión cutánea, según la estrategia de ensayo del capítulo B.4 del presente anexo si es también necesario a efectos reglamentarios | Respuesta corrosiva o irritante intensa | Se supone que es corrosivo para los ojos. No hacen falta más ensayos. |
| | ↓ | | |
| | *El producto no es corrosivo ni intensamente irritante para la piel* | | |
| | ↓ | | |
| **6** | Realizar ensayos oculares *in vitro* o *ex vivo* validados y aceptados | Respuesta corrosiva o irritante intensa | Se supone que es corrosivo o irritante intenso para los ojos, siempre que el ensayo realizado pueda utilizarse para identificar agentes corrosivos o irritantes intensos y el producto esté en el ámbito de aplicabilidad del ensayo. No hacen falta más ensayos. |
| | | Respuesta irritante | Se supone que es irritante para los ojos, siempre que el ensayo o ensayos realizados puedan utilizarse para identificar correctamente agentes corrosivos, irritantes intensos o irritantes, y el producto esté en el ámbito de aplicabilidad del ensayo o ensayos. No hacen falta más ensayos. |
| | | Respuesta no irritante | Se supone que no es irritante para los ojos, siempre que el ensayo o ensayos realizados puedan utilizarse para identificar correctamente agentes no irritantes y distinguir a estos de los productos irritantes, intensamente irritantes o corrosivos para los ojos, y el producto esté en el ámbito de aplicabilidad del ensayo. No hacen falta más ensayos. |
| | ↓ | | |
| | *No pueden utilizarse ensayos oculares in vitro o ex vivo validados y aceptados para llegar a una conclusión* | | |
| | ↓ | | |

▼M7

| | Actividad | Constatación | Conclusión |
|---|---|---|---|
| **7** | Efectuar el ensayo inicial *in vivo* en ojo de conejo utilizando un solo animal | Lesión grave de los ojos | Se considera corrosivo para los ojos. No hacen falta más ensayos. |
| | ↓ | | |
| | *No hay lesión grave o no hay respuesta* | | |
| | ↓ | | |
| **8** | Realizar el ensayo de confirmación con uno o dos animales adicionales | Corrosivo o irritante | Se considera corrosivo o irritante para los ojos. No hacen falta más ensayos. |
| | | Ni corrosiva ni irritante | Se considera que no es irritante ni corrosivo para los ojos. No hacen falta más ensayos. |

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (1996), OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22 — 24 January 1996 (http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OCDE (1998), Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, noviembre de 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161-177.

(4) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro*, 2, 19 — 26.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. Toxicology *in vitro* 12, pp.483 — 524.

(7) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 — 231.

(8) Suplemento del capítulo B.4 del presente anexo, Estrategia de evaluación secuencial de la irritación y la corrosión cutáneas.

(9) Capítulo B.40 del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: ensayo de resistencia eléctrica transcutánea.

(10) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: ensayo con modelo de piel humana.

(11) OCDE (2006), *Test No. 435: In vitro Membrane Barrier Test Method for Skin corrosion*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Paris.

▼**M7**

(12) Capítulo B.47 del presente anexo, Método de ensayo de la opacidad y permeabilidad de la córnea de bovino para identificar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves.

(13) Capítulo B.48 del presente anexo, Método de ensayo de ojo de pollo aislado para identificar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves.

▼B

B.6. **SENSIBILIZACIÓN DE LA PIEL**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

*Observaciones:*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Véase también la introducción general de la parte B.

▼B

1.2. DEFINICIONES

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

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

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

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

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

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

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

Se recomiendan las siguientes sustancias:

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

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

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

1.5. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

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

▼B

1.5.1. *Prueba de maximización en cobaya (GPMT)*

1.5.1.1. Preparación

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

1.5.1.2. Condiciones del ensayo

1.5.1.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan cepas corrientes de laboratorio de cobaya albina.

1.5.1.2.2. Número y sexo

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

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

1.5.1.2.3. Dosis

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

1.5.1.3. Procedimiento

1.5.1.3.1. Inducción

Día 0: lote tratado

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

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

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

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

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

▼B

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

Día 0: lote testigo

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

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

Inyección 2: vehículo solo

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

Días 5-7: lotes tratado y testigo

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

Días 6-8: lote tratado

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

Días 6-8: lote testigo

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

1.5.1.3.2. Provocación

Días 20-22: lotes tratado y testigo

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

1.5.1.3.3. Observación y clasificación: lotes tratado y testigo

— Aproximadamente a las 21 horas de levantar el parche, se limpia la superficie de ensaya y, en caso necesario, se elimina el pelo mediante corte al rape, afeitado o depilación.

— Unas 3 horas después (hacia tas 48 horas del inicio de la aplicación de provocación) se observa la reacción cutánea y se registra de acuerdo con la clasificación que se recoge en el apéndice.

— Aproximadamente a las 24 horas de esta observación se hace una segunda observación (72 horas), que se registra igualmente.

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

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

▼B

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

1.5.2. *Ensayo de Buehler*

1.5.2.1. Preparación

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

1.5.2.2. Condiciones del ensayo

1.5.2.2.1. Animales de laboratorio

Se utilizan cepas corrientes de laboratorio de cobaya albina.

1.5.2.2.2. Número y sexo

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

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

1.5.2.2.3. Dosis

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

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

1.5.2.3. Procedimiento

1.5.2.3.1. Inducción

Día 0: lote tratado

Se elimina el pelo de un costado (por corte al rape). El sistema del parche de ensayo debe cargarse totalmente con la sustancia en un vehículo adecuado (debe justificarse la elección del vehículo; las sustancias líquidas pueden aplicarse sin diluir, en caso de que sea conveniente).

El sistema del parche de ensayo se aplica a la zona de ensayo y se mantiene en contacto con la piel mediante una cámara o parche oclusivo y un apósito adecuado durante 6 horas.

▼B

El sistema del parche de ensayo debe ser oclusivo. Es apropiado utilizar una compresa de algodón, que puede ser circular o cuadrada, con una superficie aproximada de 4 a 6 $cm^2$. Se recomienda sujetarlo utilizando unas bridas adecuadas para garantizar la oclusión. Si se utiliza un envoltorio, puede ser necesario proceder a exposiciones complementarias.

Día 0: lote testigo

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

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

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

1.5.2.3.2. Provocación

Días 27-29: lotes tratado y testigo

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

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

1.5.2.3.3. Observación y clasificación

— Aproximadamente a las 21 horas de levantar el parche, se elimina el pelo de la superficie de provocación.

— Unas 3 horas después (hacia las 30 horas de la aplicación del parche de provocación) se observan las reacciones cutáneas y se registran de acuerdo con la clasificación recogida en el apéndice.

— Aproximadamente a las 24 horas después de la observación de las 30 horas (hacia las 54 horas de la aplicación del parche de provocación) se vuelven a observar y registrar las reacciones cutáneas.

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

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

▼B

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

2. **RESULTADOS (GPMT Y ENSAYO DE BUEHLER)**

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

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

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

**Informe del ensayo (GPMT y ensayo de Buehler)**

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

Animales de ensayo:

— cepa de cobaya utilizada,

— número, edad y sexo de los animales,

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— pesos de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones del ensayo:

— técnica de preparación del lugar para el parche,

— datos de los materiales y técnica de vendaje,

— resultado del estudio piloto con sus conclusiones sobre las concentraciones de inducción y provocación que se deban utilizar en el ensayo,

— datos de la preparación, aplicación y eliminación de la sustancia estudiada,

— justificación de la elección del vehículo,

— concentraciones del vehículo y de la sustancia estudiada utilizadas para las exposiciones de inducción y provocación, y cantidad total de sustancia aplicada para la inducción y la provocación.

Resultados:

— resumen de los resultados de la última comprobación realizada de la sensibilidad y fiabilidad (véase el punto 1.3), incluida la información sobre la sustancia, la concentración y el vehículo que se hayan utilizado,

▼B

— datos de cada animal, incluido el sistema de clasificación,

— descripción de la naturaleza y grado de los efectos observados,

— las eventuales observaciones histopatológicas.

Discusión de los resultados

Conclusiones

4. **REFERENCIAS**

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

▼B

*Apéndice*

*CUADRO*

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

0 = sin cambios visibles

1 = eritema ligero o en manchas localizadas

2 = eritema moderado y confluente

3 = eritema intenso y tumefacción.

▼M4

## B.7. TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (28 DÍAS) EN ROEDORES

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 407 de la OCDE (2008). Las directrices de ensayo 407 originales se adoptaron en 1981. En 1995 se adoptó una versión revisada con objeto de obtener nuevos datos de los animales empleados en el estudio, en particular en materia de neurotoxicidad e inmunotoxicidad.

2. En 1998, la OCDE promovió una actuación de alta prioridad orientada a revisar las directrices de ensayo existentes y desarrollar otras nuevas para la selección y evaluación de los alteradores endocrinos potenciales (8). Una faceta de esta actuación consistió en actualizar las directrices de la OCDE sobre "los estudios de toxicidad oral por administración continuada (28 días) en roedores" (TG 407), introduciendo parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina de las sustancias problema. El procedimiento se sometió a un extenso programa internacional para evaluar la pertinencia y la practicabilidad de los parámetros añadidos, la funcionalidad de estos parámetros en relación con productos químicos dotados de actividad (anti)estrogénica, (anti)androgénica y (anti)tiroidea, la reproducibilidad intra- e interlaboratorios, y la interferencia entre los nuevos parámetros y los contemplados en las TG 407 anteriores. La ingente cantidad de datos así obtenidos se ha recopilado y evaluado minuciosamente en un exhaustivo informe de la OCDE (9). El presente método de ensayo B.7 actualizado (equivalente a las directrices TG 407) es el fruto de la experiencia y de los resultados derivados del programa de investigación internacional. Este método de ensayo permite poner en relación determinados efectos de mecanismo endocrino con otros efectos toxicológicos.

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

3. Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El presente método de ensayo se propone investigar los efectos de toxicidad sobre una gran variedad de órganos o sistemas diana. Proporciona información acerca de los posibles riesgos para la salud derivados de la exposición continuada durante un período relativamente limitado, entre ellos los efectos sobre los sistemas nervioso, inmunitario y endocrino. En relación con estos criterios de valoración específicos, deberá identificar sustancias químicas con potencial neurotóxico que puedan justificar investigaciones futuras, o sustancias capaces de interferir en la fisiología de la glándula tiroides. También puede aportar datos sobre las sustancias químicas que afectan a los órganos reproductores masculinos o femeninos en los animales adultos jóvenes, o indicaciones sobre los efectos inmunológicos.

4. Los resultados de este método de ensayo B.7 se aplicarán a la identificación del peligro y a la evaluación del riesgo. Los resultados obtenidos por medio de parámetros endocrinos se valorarán en el "Marco teórico para el estudio y la evaluación de los alteradores endocrinos" (*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) de la OCDE (11). El método describe el estudio básico de toxicidad por administración continuada que puede aplicarse en el caso de sustancias para las que no está justificado un estudio de 90 días (por ejemplo, cuando el volumen de producción no supera ciertos límites), o bien como ensayo preliminar de un estudio de toxicidad a largo plazo. La duración de la exposición será de 28 días.

▼M4

5. El programa internacional de validación de los parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina potencial de una sustancia química demostró que la calidad de los datos obtenidos mediante este método de ensayo B.7 depende en gran medida de la experiencia del laboratorio de ensayo. Esto se refiere específicamente a la determinación histopatológica de los cambios cíclicos que se producen en los órganos reproductores femeninos, así como de la determinación del peso de órganos con dependencia hormonal que son de pequeño tamaño y difícil disección. Se han puesto a punto unas directrices de histopatología (19), a las que se puede acceder a través de la página web pública de la OCDE, sobre líneas directrices. Con ella se pretende ayudar a los anatomopatólogos en sus exploraciones y aumentar la sensibilidad del ensayo. Diversos parámetros han resultado ser indicadores de la toxicidad de mediación endocrina y se han incorporado al método de ensayo. Aquellos parámetros que, en el programa de validación, dieron lugar a datos insuficientes o poco significativos sobre su eficacia para ayudar a la detección de los alteradores endocrinos se proponen como criterios de valoración opcionales (véase el apéndice 2).

6. Atendiendo a los datos generados en el proceso de validación, conviene destacar que la sensibilidad del presente ensayo no es suficiente para identificar todas las sustancias con modo de acción (anti)androgénico o (anti)estrogénico (9). Este método de ensayo no se practica en la fase de la vida más sensible a la alteración endocrina. No obstante, en el proceso de validación el método de ensayo se mostró capaz de identificar sustancias que afectan débil o intensamente a la función tiroidea, así como sustancias con actividad endocrina intensa o moderada que actúan por medio de receptores estrogénicos o androgénicos, pero en la mayoría de los casos no consiguió identificar sustancias con actividad endocrina que influyen débilmente en los receptores estrogénicos o androgénicos. Por lo tanto, no podemos definirlo como un ensayo de cribado de la actividad endocrina.

7. Por consiguiente, el hecho de no detectar efectos relacionados con estos modos de acción no se puede interpretar como prueba de la ausencia de efectos sobre el sistema endocrino. Por lo que se refiere a los efectos de mecanismo endocrino, la caracterización de la sustancia no debe basarse exclusivamente en los resultados de este método de ensayo, sino que se sopesarán de las pruebas en relación con todos los datos existentes acerca de la sustancia química para caracterizar la actividad endocrina potencial. Por este motivo, toda decisión normativa acerca de la (o la caracterización de las sustancias con) actividad endocrina ha de tener un enfoque amplio, y no basarse solamente en los resultados de la aplicación del presente método de ensayo.

8. Se entiende que todos los procedimientos relacionados con los animales serán conformes a las normas locales de bienestar animal; las descripciones de cuidado y tratamiento que se facilitan a continuación constituyen requisitos de ejecución mínimos sobre los que prevalecerá la normativa local allí donde sea más estricta. La OCDE facilita también directrices sobre el tratamiento compasivo de los animales (14).

9. En el apéndice 1 se recogen las definiciones empleadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. La sustancia problema se administra diariamente por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una misma dosis por lote durante un período de 28 días. A lo largo del período de administración, se observa a los animales todos los días atentamente con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practicará la autopsia de los animales que mueran o reciban la eutanasia durante el estudio, y cuando este concluya se procederá a la eutanasia y autopsia de los animales supervivientes. Un estudio de 28 días proporciona información

▼M4

sobre los efectos de la exposición oral continuada y permite determinar la necesidad de realizar nuevos estudios a largo plazo. También puede aportar datos para seleccionar las concentraciones que se aplicarán en los estudios más prolongados. Los datos derivados de este método de ensayo deben permitir una caracterización toxicológica de la sustancia problema que oriente sobre la relación dosis-respuesta y permita determinar la máxima concentración sin efectos adversos observados (NOAEL, No Observed Adverse Effect Level).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

11. La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Si los parámetros especificados en el presente método de ensayo B.7 se investigan en otra especie de roedor, habrá que justificarlo minuciosamente. Si bien es biológicamente posible que otras especies respondan a los agentes tóxicos de manera afín a la rata, el uso de especies de menor tamaño conlleva una variabilidad mayor, debido a las dificultades técnicas que plantea la disección de órganos más pequeños. En el programa internacional de validación de la detección de alteradores endocrinos, la única especie utilizada fue la rata. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras el destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Cuando se realice un estudio de toxicidad oral por administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad a largo plazo, es preferible que se utilicen en ambos estudios animales procedentes de la misma cepa y del mismo origen.

**Alojamiento y alimentación de los animales**

12. Todos los procedimientos serán conformes a las normas habituales del cuidado de los animales de laboratorio. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación debe ser artificial, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. Si la sustancia problema se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta. Los animales se alojarán en pequeños grupos del mismo sexo; podrán alojarse individualmente si está científicamente justificado. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de 5 animales en cada jaula.

13. Se analizará regularmente la comida para detectar posibles contaminantes. Se conservará una muestra de la dieta hasta el momento de concluir el informe.

**Preparación de los animales**

14. Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos 5 días antes de empezar el tratamiento experimental para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

**Preparación de las dosis**

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

▼M4

16. En caso necesario, se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicológicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo.

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

17. Deben utilizarse por los menos 10 animales (cinco hembras y cinco machos) por cada dosis. Si está prevista la eutanasia de algunos animales durante el ensayo, debe aumentarse el número total en una cantidad igual a la que vaya a sufrir la eutanasia antes de terminar el estudio. Puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) en los grupos de control y de dosis más elevada para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos tóxicos, al menos durante los 14 días siguientes al tratamiento.

**Posología**

18. Generalmente, se emplean al menos tres lotes tratados y uno de control; pero si, a partir de la evaluación de otros datos, no cabe esperar ningún efecto con la dosis de 1 000 mg/kg peso corporal/día, puede realizarse un ensayo límite. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio (con animales de la misma cepa y procedencia) para ayudar a determinar el intervalo de dosificación que debe emplearse. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben ser tratados de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia problema, el lote de control recibirá el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.

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

20. Si se observan signos de toxicidad general (por ejemplo, peso corporal reducido, efectos hepáticos, cardíacos, pulmonares o renales, etc.) u otras alteraciones que no son necesariamente respuestas tóxicas (por ejemplo, ingesta de alimentos reducida, hiperplasia hepática), habrá que interpretar con prudencia los efectos observados sobre las variables inmunitarias, neurológicas o endocrinas.

**Ensayo límite**

21. Si, en un ensayo en el que se administra un solo nivel de dosis de al menos 1 000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración en la comida o en el agua de bebida, en el que se alcanza una concentración equivalente en los alimentos o el agua de bebida (según las determinaciones del peso corporal) siguiendo los procedimientos descritos en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente afines, no debiera esperarse la aparición de toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

▼M4

**Administración de las dosis**

22. Las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales, 7 días por semana, durante 28 días. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. Dicho volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

23. En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren en la nutrición normal o el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (en ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en relación con el peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deberá utilizarse en ambos estudios una dieta similar.

**Observaciones**

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

25. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registrará el estado de salud de los animales. Se observarán todos los animales al menos dos veces el día para detectar posibles signos de morbilidad y mortalidad.

26. Todos los animales deben someterse a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y que las observaciones sean realizadas de preferencia por observadores ajenos al tratamiento. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (2).

27. En la cuarta semana de exposición se hará una evaluación de la reactividad sensorial frente a estímulos de diferente naturaleza (2) (estímulos auditivos, visuales y propioceptivos) (3) (4) (5), así como de la fuerza prensil (6) y de la actividad motriz (7). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

▼M4

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

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

30. En la autopsia se podrá determinar (opcionalmente) el ciclo estral de todas las hembras tomando frotis vaginales. Estas observaciones permitirán establecer la fase del ciclo estral en el momento del sacrificio y serán de ayuda en la evaluación histológica de los tejidos sensibles a los estrógenos [véase el documento de orientación sobre histopatología (19)].

**Peso corporal y consumo de alimentos y agua**

31. Al menos una vez por semana se pesarán todos los animales y se calculará el consumo de alimentos. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, deberá medirse también el consumo de agua al menos semanalmente.

**Hematología**

32. Deben practicarse los siguientes exámenes hematológicos al final del período de ensayo: hematocrito, concentraciones de hemoglobina, recuento de eritrocitos y reticulocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación sanguínea. Si se sabe o sospecha que la sustancia problema o sus metabolitos potenciales tienen propiedades oxidantes, habrá que determinar además las concentraciones de metahemoglobina y de cuerpos de Heinz.

33. Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado, justo antes de la eutanasia de los animales (o como parte del método de eutanasia), y conservarse en condiciones adecuadas. Los animales estarán en ayunas desde el día anterior a la eutanasia ([1]).

**Bioquímica clínica**

34. Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos y, especialmente, en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes de la eutanasia o como parte del método de eutanasia (aparte de los moribundos o sacrificados antes de que termine el ensayo). Los parámetros medidos en el plasma y el suero deben incluir las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albúminas, al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltranspeptidasa, o glutamato-deshidrogenasa) y los ácidos biliares. La determinación de otras enzimas (de origen hepático o no) y de la bilirrubina puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.

35. Pueden realizarse, con carácter facultativo, las siguientes determinaciones en la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas.

([1]) El ayuno desde la víspera es preferible para realizar ciertos análisis en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, el ayuno desde la víspera puede influir en el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia problema se administra con los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Si se adopta el ayuno desde la víspera, deben realizarse análisis de bioquímica clínica después de la realización de las observaciones funcionales en la cuarta semana del estudio.

▼M4

36. Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores plasmáticos o séricos de lesiones histológicas generales. Otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas de la sustancia estudiada pueden afectar a las funciones metabólicas correspondientes incluyen las concentraciones de calcio, fosfato, triglicéridos, hormonas específicas y colinesterasa. Debe valorarse la necesidad de hacer estos análisis con las sustancias químicas de determinadas clases o bien según cada caso.

37. Aunque durante la evaluación internacional de los parámetros de tipo endocrino no se pudo demostrar una clara ventaja a favor de la determinación de las hormonas tiroideas (T3, T4) y de la TSH, cuando se observen indicios de algún efecto sobre el eje hipófiso-tiroideo puede ser de utilidad conservar muestras de plasma o suero para hacer valoraciones de T3, T4 y TSH (opcionales). Estas muestras se congelan a – 20 °C para su conservación. Distintos factores pueden influir en la variabilidad y en el valor absoluto de las concentraciones hormonales:

— el momento del sacrificio, debido a la variación diurna de las concentraciones hormonales,

— el método de eutanasia, que se escogerá para evitar a los animales un sufrimiento indebido que pueda influir en las concentraciones hormonales,

— los kits de análisis hormonal, que pueden presentar diferencias en sus curvas patrón.

El examen histopatológico es más fiable que el hormonal para llegar a una identificación definitiva de las sustancias químicos con actividad tiroidea.

38. Las muestras de plasma destinadas específicamente al análisis hormonal se obtendrán a la misma hora del día. Se recomienda contemplar la posibilidad de determinar los valores de T3, T4 y TSH basándose en las alteraciones histopatológicas del tiroides. Las cifras obtenidas al analizar concentraciones de hormonas varían con los kits comerciales que se usan para el análisis. En consecuencia, no siempre es posible establecer criterios de valoración basados en datos históricos uniformes. Por otro lado, los laboratorios procurarán mantener los coeficientes de variación por debajo de 25 en el caso de T3 y T4, y por debajo de 35 para la TSH. Todas las concentraciones se expresarán en ng/ml.

39. Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración o, preferiblemente, en un grupo de animales no incluidos en los lotes experimentales.

ANATOMÍA PATOLÓGICA

**Autopsia macroscópica**

40. Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimo, próstata + vesículas seminales con las glándulas coagulantes en conjunto, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados antes de concluir el ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Al seccionar la próstata y sus anejos se procurará evitar la punción de las vesículas seminales llenas de líquido. Otra posibilidad es diseccionar y pesar las vesículas seminales y la próstata después de fijarlas.

▼M4

41. Facultativamente, otros dos tejidos se pueden pesar lo antes posible tras la disección para evitar su desecación: los ovarios pareados (peso húmedo) y el útero y cuello del útero [se ofrecen orientaciones sobre la excisión y preparación de los tejidos uterinos para determinar su peso en las TG 440 de la OCDE (18)].

42. El peso de la glándula tiroides puede determinarse (opcionalmente) después de su fijación. Su excisión se hará también de manera cuidadosa y solo después de la fijación para evitar daños tisulares, que comprometerían los resultados del examen histopatológico.

43. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (véase el punto 47): todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal, ojos, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, timo, tiroides, tráquea y pulmones (conservados mediante inflado con fijador seguido de inmersión), gónadas (testículos y ovarios), órganos sexuales secundarios (útero y cuello, epidídimo, próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes), vagina, vejiga urinaria, ganglios linfáticos [además del ganglio más proximal debería obtenerse otro ganglio linfático, dependiendo de la experiencia del laboratorio (15)], nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, músculo esquelético y hueso con la médula ósea (una sección o médula ósea aspirada y recién montada). Se recomienda fijar los testículos mediante inmersión en fijador de Bouin o de Davidson modificado (16) (17). Con una aguja se punciona suave y superficialmente la túnica albugínea por ambos polos del órgano para permitir la rápida penetración del fijador. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema.

44. Los siguientes tejidos pueden proporcionar valiosas indicaciones sobre los efectos de carácter endocrino: gónadas (ovarios y testículos), órganos sexuales secundarios (útero y cuello, epidídimo, vesículas y glándulas seminales, próstata dorsolateral y ventral), vagina, hipófisis, glándula mamaria de machos, tiroides y cápsula suprarrenal. Las alteraciones de las glándulas mamarias de machos no se han documentado suficientemente, pero este parámetro puede ser muy sensible a las sustancias dotadas de actividad estrogénica. La observación de los órganos y tejidos que no se recogen en el punto 43 es opcional (véase el apéndice 2).

45. El documento de orientación sobre histopatología (19) proporciona más información detallada acerca de la disección, fijación, sección e histopatología de los tejidos endocrinos.

46. En el programa internacional de investigación se obtuvieron indicios en el sentido de que es posible identificar los efectos endocrinos sutiles de sustancias que tienen escasa potencia para afectar a la homeostasis de las hormonas sexuales detectando trastornos en la sincronización del ciclo estral de diversos tejidos, antes que las alteraciones histopatológicas evidentes en los órganos sexuales femeninos. Si bien no se ha obtenido una prueba definitiva de tales efectos, se recomienda tener en cuenta los signos de posible asincronía del ciclo estral a la hora de interpretar la histopatología de los ovarios (células foliculares, tecales y granulosas), el útero, el cuello y la vagina. Si se determina la fase del ciclo a partir de frotis vaginales, se podría incluir también en la comparación.

▼M4

**Examen histopatológico**

47. Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, estos exámenes se ampliarán a animales de todos los demás lotes tratados.

48. Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

49. Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

RESULTADOS E INFORME

**Resultados**

50. Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.

51. Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La comparación de los efectos a lo largo de un intervalo de dosis evitaría el uso de múltiples pruebas t. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

52. Por motivos de control de calidad, se propone recopilar los datos previos relativos a los controles y calcular coeficientes de variación de las variables numéricas, especialmente las relacionadas con la detección de alteradores endocrinos. Estos datos se pueden usar con fines de comparación al evaluar los estudios actuales.

**Informe del ensayo**

53. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

— Datos de identificación.

*Vehículo (si procede):*

— Justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

*Animales sometidos a ensayo:*

— Especie y cepa empleada.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— Peso de cada animal al inicio del ensayo.

— Justificación de la especie si es distinta de la rata.

*Condiciones de ensayo:*

— Justificación de la selección de las dosis.

— Datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado.

▼**M4**

— Datos de la administración de la sustancia problema.

— Factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede.

— Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

*Parámetros opcionales*

— Listado de parámetros opcionales

*Resultados:*

— Peso corporal y variaciones del mismo.

— Consumo de alimentos y de agua, si se ha medido.

— Datos de respuestas tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad.

— Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).

— Evaluación de la actividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz.

— Pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia.

— Pruebas bioquímicas con los correspondientes valores de referencia.

— Peso corporal en el momento de la eutanasia y datos sobre el peso de los órganos.

— Observaciones de la autopsia.

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas.

— Datos sobre la absorción, si los hay.

— Tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

*Discusión de los resultados.*

*Conclusiones.*

▼M4

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Actividad antitiroidea:** capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona tiroidea natural (por ejemplo, $T_3$) en el organismo de un mamífero.

**Actividad tiroidea:** capacidad de una sustancia para actuar como una hormona tiroidea natural (por ejemplo, $T_3$) en el organismo de un mamífero.

**Androgenicidad:** capacidad de una sustancia para actuar como una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

**Antiandrogenicidad:** capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

**Antiestrogenicidad:** capacidad de una sustancia para inhibir la acción de una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17-beta estradiol) en el organismo de un mamífero.

**Dosis:** cantidad de sustancia problema administrada. Se expresa en peso de sustancia por unidad de peso del animal y por día (por ejemplo, mg/kg peso corporal/día) o en concentración constante en la dieta.

**Estrogenicidad:** capacidad de una sustancia química para actuar como una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17-beta-estradiol) en el organismo de un mamífero.

**NOAEL:** sigla inglesa correspondiente a la máxima dosis sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

**Posología:** término general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

**Sustancia problema:** cualquier sustancia o mezcla estudiada mediante este método de ensayo.

**Toxicidad evidente:** término general que describe los signos claros de toxicidad que aparecen tras la administración de una sustancia problema. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del peligro y deben ser tales que, ante un aumento de la dosis administrada, pueda esperarse la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.

**Validación:** procedimiento científico diseñado para caracterizar los requisitos operativos y las limitaciones de un método de ensayo y para demostrar su fiabilidad y pertinencia en relación con un propósito determinado.

▼M4

*Apéndice 2*

**Parámetros recomendados para la detección de los alteradores endocrinos (AE) en el presente método de ensayo B.7**

| Parámetros obligatorios | Parámetros opcionales |
|---|---|
| Peso | |
| — Testículos | — Ovarios |
| — Epidídimo | — Útero y cuello |
| — Cápsulas suprarrenales | — Tiroides |
| — Próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes | |
| Examen histopatológico | |
| — Gónadas: | — Frotis vaginal |
| — Testículos y | — Glándulas mamarias de machos |
| — Ovarios | — Hipófisis |
| — Órganos sexuales secundarios: | |
| — Epidídimo, | |
| — Próstata + vesículas seminales y glándulas coagulantes | |
| — Útero y cuello | |
| — Cápsulas suprarrenales | |
| — Tiroides | |
| — Vagina | |
| Determinaciones hormonales | |
| | — Concentración en sangre de T3 y T4 |
| | — Concentración en sangre de TSH |

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the *ad hoc* Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

(2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60

(3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691-704.

(5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

▼M4

(7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(9) OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

(10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

(11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html

(12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

(13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

(14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: 404-407.

(16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(17) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM.(2002) Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, 524-533.

(18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N$^{o}$ 440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

(19) OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

## B.8. TOXICIDAD SUBAGUDA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 28 DÍAS

ÍNDICE

El presente método de ensayo B.8 ha sido diseñado para caracterizar debidamente la toxicidad por inhalación de una sustancia problema después de la exposición continuada durante un período limitado (28 días), y para recabar datos que permitan hacer una evaluación cuantitativa del riesgo por inhalación. Se forman lotes de al menos 5 roedores machos y 5 hembras y se exponen 6 horas al día durante 28 días a: a) la sustancia problema a tres o más niveles de concentración; b) aire filtrado (control negativo), y/o c) el vehículo (control del vehículo). Habitualmente los animales se exponen 5 días por semana, aunque se acepta exponerlos hasta 7 días por semana. Se estudian siempre animales machos y hembras, pero pueden exponerse a diferentes niveles de concentración si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema. Este método concede al director del estudio suficiente flexibilidad para incluir lotes satélite (reversibilidad), lavados broncoalveolares (BAL), pruebas neurológicas y otras evaluaciones anatomopatológicas e histopatológicas orientadas a caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema.

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 412 de la OCDE (2009). Las directrices originales sobre ensayos de toxicidad subaguda por inhalación (TG 412) fueron adoptadas en 1981 (1). El presente método de ensayo B.8 (equivalente a las TG 412 revisadas) se ha actualizado para reflejar el estado actual de la ciencia y satisfacer las necesidades normativas actuales y futuras.

2. Este método permite caracterizar los efectos adversos que se producen después de la exposición por inhalación diaria continuada de una sustancia problema durante 28 días: Los datos derivados de los estudios de toxicidad subaguda por inhalación durante 28 días pueden servir para efectuar evaluaciones cuantitativas del riesgo [siempre que no vayan seguidos de un estudio de toxicidad subcrónica por inhalación durante 90 días (capítulo B.29 del presente anexo)]. Los mismos datos pueden además orientar en la selección de las concentraciones aplicadas en estudios más prolongados, como los de toxicidad subcrónica por inhalación durante 90 días. El presente método de ensayo no está específicamente destinado a la investigación de nanomateriales. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento GD 39 (2).

### CONSIDERACIONES INICIALES

3. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema. En la selección de las concentraciones idóneas de estudio resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro,* uso(s) previsto(s) y posible exposición humana, datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de compuestos químicos estructuralmente afines, y resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad aguda por inhalación. Si se prevé o se observa neurotoxicidad en el transcurso del estudio, el director del mismo puede decidir la incorporación de las evaluaciones pertinentes, como una batería de observación funcional (FOB) y registros de la actividad motriz: Si bien el calendario de las exposiciones en relación con las evaluaciones concretas puede ser crítico, la realización de estas actividades complementarias no debe interferir en el diseño básico del estudio.

▼M4

4. Se pueden estudiar diluciones de sustancias corrosivas o irritantes a concentraciones capaces de inducir el grado de toxicidad esperado [véase GD 39 (2)]. Al exponer los animales a estos productos, las concentraciones diana deben ser lo bastante bajas para no provocar un dolor y sufrimiento intensos, pero suficientes para obtener una curva de concentración-respuesta que satisfaga los objetivos científicos y normativos del ensayo. Dichas concentraciones se escogerán según cada caso, preferiblemente sobre la base de estudios del intervalo analítico debidamente diseñados que arrojen información sobre el parámetro principal, el umbral de irritación y el tiempo de aparición de los síntomas (véanse los puntos 11-13). Se justificará la elección de las concentraciones.

5. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva. Los animales moribundos se contabilizan como muertes durante el ensayo. En el documento de orientación sobre criterios de tratamiento compasivo [Guidance Document on Humane Endpoints de la OCDE (3)] se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

6. Hay que utilizar roedores adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie preferida es la rata. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

**Preparación de los animales**

7. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la asignación aleatoria, los animales serán adultos jóvenes de entre 7 y 9 semanas de edad. Los pesos corporales se desviarán a lo sumo en ± 20 % del peso medio de cada sexo. Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar el ensayo, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

**Zootecnia**

8. Los animales se identificarán de manera individual, a ser posible con transpondedores subcutáneos, a fin de facilitar la observación y evitar confusiones. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario acostumbrar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre a través del pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. La iluminación será artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

▼M4

**Cámaras de inhalación**

9. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzan mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento GD 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

**Concentraciones límite**

10. A diferencia de los estudios de toxicidad aguda, en los estudios de toxicidad subaguda por inhalación durante 28 días no hay concentraciones límite definidas. La concentración máxima estudiada dependerá de: 1) la máxima concentración alcanzable, 2) el nivel de exposición humana en "el escenario más desfavorable", 3) la necesidad de mantener un suministro de oxígeno adecuado, y/o 4) la atención al bienestar de los animales. Si no se dispone de datos de concentración límite, es aplicable el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (13) [hasta una concentración máxima de 5 mg/l para los aerosoles, de 20 mg/l para los vapores y de 20 000 ppm para los gases; véase el documento GD 39 (2)]. Cuando sea preciso superar estos límites en el estudio de gases o sustancias problemas altamente volátiles (por ejemplo, refrigerantes), habrá que justificar los motivos. La concentración límite será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

**Estudio de determinación del intervalo**

11. Antes de proceder al estudio principal, puede ser necesario realizar un estudio para determinar el intervalo analítico. Un estudio de determinación del intervalo es más completo que un estudio preliminar, por cuanto no se limita a la selección de las concentraciones. La información recabada en este tipo de estudio puede ser decisiva para el éxito del estudio principal. Un estudio de determinación del intervalo puede, por ejemplo, aportar información técnica referente a los métodos analíticos y a la granulometría, la detección de los mecanismos de toxicidad, los parámetros anatomopatológicos e histopatológicos, y las estimaciones de lo que podrán ser el NOAEL y la concentración tóxica mínima en un estudio principal. El director de la investigación decidirá si ha de basarse en el estudio de determinación del intervalo para identificar el umbral de irritación de las vías respiratorias (con la histopatología de las vías respiratorias, las pruebas de la función pulmonar o el lavado broncoalveolar), la concentración máxima tolerada sin causar un sufrimiento indebido a los animales y los parámetros que caractericen mejor la toxicidad de la sustancia problema.

12. Un estudio de determinación del intervalo puede hacerse con uno o más niveles de concentración. A cada nivel de concentración no deben exponerse más de tres machos y tres hembras. El estudio de determinación del intervalo tendrá una duración mínima de 5 días y máxima (generalmente) de 14 días. En el informe del estudio se justificará la selección de las concentraciones destinadas al estudio principal. La finalidad del estudio principal es demostrar una relación concentración-respuesta basada en lo que se supone el parámetro más sensible. La concentración más baja será idealmente una en la que no se observen efectos adversos, mientras que la concentración más alta será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

▼M4

13. A la hora de elegir los niveles de concentración para el estudio de determinación del intervalo, se tendrá en cuenta toda la información disponible, incluidos las relaciones entre estructura y actividad y los datos de sustancias afines (véase el punto 3). Un estudio de determinación del intervalo puede verificar o refutar los parámetros relacionados con los mecanismos de acción que *a priori* se consideran más sensibles, como la inhibición de la colinesterasa por los organofosforados, la formación de metahemoglobina por agentes eritrotóxicos, las hormonas tiroideas ($T_3$ y $T_4$), en el caso de tirotóxicos, y la presencia de proteínas, LDH, o neutrófilos en el lavado broncoalveolar en el caso de partículas inocuas escasamente solubles o de aerosoles que son irritantes pulmonares.

**Estudio principal**

14. El estudio principal de toxicidad subaguda comprende habitualmente tres niveles de concentración, además de lotes de control negativo (aire) y/o testigo del vehículo (véase el punto 17). Se recurrirá a todos los datos disponibles para ayudar a la selección de los niveles de exposición adecuados, incluidos los resultados de los estudios de toxicidad sistémica, metabólicos y cinéticos (poniendo especial atención para evitar niveles de concentración elevados que saturen los procesos cinéticos). Cada lote de ensayo se compone de al menos 10 roedores (5 machos y 5 hembras), que se exponen a la sustancia química estudiada 6 horas al día en un régimen de 5 días por semana durante un período de 4 semanas (la duración total del estudio es de 28 días). También se admite exponer a los animales 7 días por semana (por ejemplo, cuando se estudian productos farmacéuticos para inhalación). Si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema, podrán exponerse los dos sexos a diferentes niveles de concentración con el fin de optimizar la relación concentración-respuesta, tal como se describe en el punto 15. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificarán los motivos cuando el tiempo de exposición sea inferior a 6 horas/día o cuando sea necesario efectuar un estudio de exposición de cuerpo entero de larga duración (por ejemplo, 22 horas/día) [véase el documento GD 39 (2)]. Se privará de comida a los animales durante el período de exposición, a menos que este exceda de 6 horas. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.

15. Las concentraciones diana seleccionadas deben servir para identificar el órgano o los órganos diana y para demostrar una clara relación concentración-respuesta.

— El nivel de concentración más elevado debe inducir efectos tóxicos, pero sin provocar letalidad o daños persistentes que impidan hacer una evaluación significativa.

— El nivel o los niveles de concentración intermedios se espaciarán para obtener una graduación o escala de los efectos tóxicos desde el nivel más bajo al más elevado.

— La concentración más baja debe producir escasos o nulos signos de toxicidad.

**Estudio satélite (de reversibilidad)**

16. Es posible recurrir a un estudio satélite (de reversibilidad) para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de toxicidad durante un período de duración adecuada, pero nunca inferior a 14 días, después del tratamiento. Los lotes satélite (de reversibilidad) se componen de 5 machos y 5 hembras, que se exponen simultáneamente a los animales de experimentación del estudio principal. Los lotes del estudio satélite (de reversibilidad) deben exponerse a la sustancia problema al nivel de concentración más elevado y, en la medida necesaria, se emplearán simultáneamente lotes testigo con aire y/o con el vehículo (véase el punto 17).

▼M4

**Animales de control**

17. Los animales de control negativo (con aire) simultáneo se tratan de manera idéntica a los animales del lote experimental, excepto en que se exponen al aire filtrado en lugar de a la sustancia problema. Cuando se utiliza agua o cualquier otra sustancia para ayudar a crear la atmósfera experimental, en el estudio debe incluirse un lote testigo del vehículo, en lugar del lote de control negativo (con aire). Como vehículo se usará agua en la medida de lo posible. Cuando se use agua como vehículo, los animales de control se expondrán a una atmósfera de aire con la misma humedad relativa que los grupos expuestos a la sustancia problema. La selección de un vehículo idóneo se basará en un ensayo preliminar debidamente realizado o bien en los datos históricos. Cuando no se conoce bien la toxicidad de un vehículo, el director del estudio puede decidir el uso de ambos lotes, el de control negativo (con aire) y el testigo del vehículo, pero no es en absoluto recomendable. Si los datos previos revelan que un vehículo es atóxico, no hay necesidad de emplear un grupo de control negativo (con aire), y solo se usará un lote testigo del vehículo. Si un ensayo preliminar de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada y debe utilizarse este control del vehículo.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

**Administración de las concentraciones**

18. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico investigado dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará dicha sustancia durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas. Los materiales particulados pueden someterse a procesos mecánicos para reducir el tamaño de partícula. Se ofrecen más orientaciones en el documento de orientación GD 39 (2).

**Distribución del tamaño de partícula**

19. Se controlará la granulometría de todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 3 μm, con una desviación típica geométrica ($\sigma_g$) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (4). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Así, por ejemplo, las partículas de los humos metálicos pueden tener un tamaño inferior al mencionado intervalo, mientras que las partículas con carga y las fibras pueden superarlo.

**Preparación de la sustancia problema en un vehículo**

20. En condiciones ideales, la sustancia problema debería estudiarse sin ningún vehículo. Si es necesario emplear un vehículo para generar una concentración de sustancia problema y un tamaño de partícula adecuados, se le dará preferencia al agua. Siempre que una sustancia problema se disuelva en un vehículo, debe demostrarse su estabilidad.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

**Caudal de aire de la cámara**

21. El caudal de aire de la cámara de exposición se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión en tiempo real de la concentración atmosférica (o la estabilidad temporal) del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de la inhalación que resultan de interés. Si la concentración se supervisa en tiempo real, es posible reducir la

▼M4

frecuencia de medición del caudal de aire limitándola a una sola medición por exposición y día. Habrá que tomar especiales precauciones para evitar la reinspiración en las cámaras de exposición solo por la nariz. La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a respetar estos valores de referencia, habrá que medir las concentraciones de ambos gases. Si las mediciones del primer día de exposición revelan que estos gases están presentes a las concentraciones adecuadas, no serán necesarias nuevas mediciones.

**Temperatura y humedad relativa de la cámara**

22. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. Siempre que sea posible, la humedad relativa presente en la zona de respiración de los animales, tanto en las exposiciones de solo por la nariz como en las de cuerpo entero, se supervisará de manera continua y se registrará cada hora durante la exposición. La humedad relativa debe mantenerse preferiblemente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia problema con el método de ensayo).

**Sustancia problema: concentración nominal**

23. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara de inhalación. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

**Sustancia problema: concentración real**

24. La concentración real es la concentración de sustancia problema comprobada por muestreo en la zona de respiración de los animales de una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos, como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trata de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases.

25. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema durante todo el estudio, lote que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

▼M4

26. La atmósfera de exposición debe mantenerse constante en la medida de lo posible. Para demostrar la estabilidad de las condiciones de exposición se puede usar un equipo de supervisión en tiempo real, como un fotómetro de proceso para aerosoles o un analizador de hidrocarburos totales para vapores. La concentración real presente en la cámara deberá medirse al menos 3 veces por cada nivel y día de exposición. Pero si ello no es posible debido a un caudal de aire limitado o a que las concentraciones son bajas, se acepta una muestra por período de exposición. En ese caso, lo ideal es recoger la muestra durante todo el período de exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, ni en más de ± 20 % en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y documentará el tiempo de equilibrado ($t_{95}$) de la cámara. La duración de una exposición incluye el tiempo durante el cual se genera la sustancia problema. Este abarca los tiempos transcurridos hasta alcanzar el equilibrio en la cámara ($t_{95}$) y hasta la extinción. Se ofrecen indicaciones para el cálculo de $t_{95}$ en el documento de orientación nº 39 (2).

27. Cuando se manejan mezclas muy complejas formadas por gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación. Por consiguiente, se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, por cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o del componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (2).

**Sustancia problema: granulometría**

28. La granulometría de los aerosoles debe determinarse al menos con periodicidad semanal por cada nivel de concentración, con ayuda de un impactador de cascada o un aparato alternativo, como un cribador de partículas. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio.

29. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis por tamaños de partícula tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia para todas las concentraciones analizadas en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir el ensayo.

30. Se controlará la granulometría en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases.

OBSERVACIONES

31. Los animales se someterán a observación clínica frecuente antes, durante y después del período de exposición. Pueden estar indicadas observaciones más frecuentes, dependiendo de la respuesta de los animales durante la exposición. Cuando la observación de los animales esté dificultada por el uso de tubos de sujeción, por la escasa iluminación de las cámaras de cuerpo entero o por la opacidad ambiental, se someterán a observación minuciosa después de la exposición. Las observaciones realizadas con anterioridad a la exposición del día siguiente permiten determinar la posible reversibilidad o exacerbación de los efectos tóxicos.

▼M4

32. Todas las observaciones se registrarán en fichas individuales de cada animal. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

33. Las observaciones en la jaula deberían incluir los cambios en la piel, ojos y membranas mucosas; los cambios en los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento. En el protocolo del estudio se pueden incluir otras evaluaciones del tipo de pruebas cinéticas, biovigilancia, pruebas de la función pulmonar, retención de materiales escasamente solubles que puedan acumularse en el tejido pulmonar y cambios comportamentales.

PESO CORPORAL

34. Se registrará el peso de cada animal poco antes de la primera exposición (día 0), y después dos veces por semana (por ejemplo, los viernes y lunes para demostrar la recuperación durante un fin de semana sin exposición, o en un intervalo que permita evaluar la toxicidad sistémica) y en el momento de la muerte o la eutanasia. Si no se observan efectos en las 2 primeras semanas, el peso corporal se podrá registrar semanalmente durante el resto del estudio. Si se utilizan animales satélite (reversibilidad), se seguirán pesando semanalmente durante todo el período de recuperación. Al concluir el estudio, se pesarán todos los animales poco antes del sacrificio para permitir calcular sin sesgos la relación entre el peso de los órganos y el peso corporal.

CONSUMO DE AGUA Y DE ALIMENTOS

35. El consumo alimentario se medirá cada semana. También se puede medir el consumo de agua.

PATOLOGÍA CLÍNICA

36. Deben hacerse evaluaciones de patología clínica en todos los animales, incluidos los testigo y los satélite (reversibilidad), cuando sean sacrificados. Se registrará el intervalo de tiempo transcurrido entre el final de la exposición y la toma de muestras de sangre, particularmente si la recuperación del parámetro valorado es rápida. Está indicado obtener muestras al final del período de exposición cuando se trata de parámetros con una semivida plasmática corta (por ejemplo, COHb, CHE y MetHb).

37. En el cuadro 1 se recogen los parámetros de patología clínica que se suelen exigir en todos los estudios toxicológicos. El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino solo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos. El director del estudio puede decidir la evaluación de otros parámetros para caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema (colinesterasa, lípidos, hormonas, equilibrio ácido-base, metahemoglobina o cuerpos de Heinz, creatina-cinasa, cociente mieloide/eritroide, troponinas, gases en sangre arterial, lactato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa, glutamato-deshidrogenasa y gamma-glutamil-transpeptidasa).

▼M4

*Cuadro 1*

**Parámetros de patología clínica habituales**

| Hematología | |
|---|---|
| Recuento de eritrocitos | Recuento de leucocitos |
| Hematocrito | Fórmula leucocitaria |
| Concentración de hemoglobina | Recuento de plaquetas |
| Hemoglobina corpuscular media | Capacidad de coagulación (seleccionar una): |
| Volumen corpuscular medio | — Tiempo de protrombina |
| Concentración de hemoglobina corpuscular media | — Tiempo de coagulación |
| Reticulocitos | — Tiempo de tromboplastina parcial |
| **Bioquímica** | |
| Glucosa (*) | Alanina-aminotransferasa |
| Colesterol total | Aspartato-aminotransferasa |
| Triglicéridos | Fosfatasa alcalina |
| Nitrógeno ureico en sangre | Potasio |
| Bilirrubina total | Sodio |
| Creatinina | Calcio |
| Proteínas totales | Fósforo |
| Albúmina | Cloruros |
| Globulinas | |
| **Análisis de orina (opcional)** | |
| Aspecto (color y turbidez) | Proteínas totales |
| Volumen | Glucosa |
| Densidad y osmolalidad | Sangre/células sanguíneas |
| pH | |

(*) Puesto que un período de ayuno prolongado puede introducir un sesgo en las determinaciones de glucosa entre los animales de control y los tratados, el director del estudio decidirá si es apropiado o no imponer dicho ayuno a los animales. Si se impone un período de ayuno, será acorde a la especie empleada; para las ratas puede ser de 16 horas (ayuno desde la víspera). La determinación de la glucosa en ayunas puede hacerse con ayuno desde la víspera durante la última semana de exposición, o bien con ayuno desde la víspera antes de proceder a la autopsia (en este último caso, con la determinación de todos los restantes parámetros de patología clínica).

38. Cuando hay indicios de que las vías respiratorias bajas (alvéolos) son el lugar principal de depósito y retención, el lavado broncoalveolar (BAL) puede ser la técnica de elección para analizar cuantitativamente los parámetros hipotéticamente dependientes de la dosis relacionados con la aparición de alveolitis, inflamación pulmonar y fosfolipidosis. Ello permite demostrar debidamente la relación dosis-respuesta y la evolución en el tiempo del daño alveolar. En el fluido BAL se puede efectuar el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria, y medir las proteínas totales y la lactato deshidrogenasa. Otros parámetros dignos de tenerse en cuenta son los indicadores de daño lisosomal, fosfolipidosis, fibrosis e inflamación alérgica o irritativa, como puede ser la determinación de las citocinas o quimiocinas proinflamatorias. Generalmente, las determinaciones realizadas en el BAL son complementarias de los resultados del examen histopatológico, pero no pueden sustituirlos. En el documento GD 39 (2) se facilitan indicaciones sobre el modo de realizar un lavado pulmonar.

▼M4

ANATOMÍA PATOLÓGICA MACROSCÓPICA Y PESO DE LOS ÓRGANOS

39. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a sangrado total (de ser factible) y a autopsia macroscópica. Se documentará el tiempo transcurrido entre el final de la última exposición de cada animal y su sacrificio. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de comprobar la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a una temperatura suficientemente baja para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención a las alteraciones de las vías respiratorias.

40. En el cuadro 2 se indican los órganos y tejidos que durante la autopsia macroscópica deben conservarse en un medio idóneo para su examen histopatológico. La conservación de los órganos y tejidos entre corchetes, así como de cualquier otro órgano o tejido, se hará a criterio del director del estudio. Los órganos destacados **en negrita** se deben limpiar de adherencias y pesar lo antes posible después de la disección para evitar su desecación. El tiroides y los epidídimos solo se pesarán en caso necesario, porque artefactos debidos a las adherencias pueden dificultar la evaluación histopatológica. Los tejidos y órganos se fijan en formol con amortiguador al 10 % o en otro fijador apropiado inmediatamente después de la autopsia, dejando pasar un mínimo de 24-48 horas antes de la limpieza de adherencias, dependiendo del fijador empleado.

*Cuadro 2*

**Órganos y tejidos conservados durante la autopsia macroscópica**

| | |
|---|---|
| **Cápsulas suprarrenales** | Vesículas seminales |
| Médula ósea (y/o aspirado reciente) | Médula espinal (cervical, medio dorsal y lumbar) |
| **Encéfalo** (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia) | **Bazo** |
| [Ojos (retina, nervio óptico) y párpados] | Estómago |
| **Corazón** | **Testículos** |
| **Riñones** | **Timo** |
| Laringe (3 secciones de corte histológico, 1 de ellas de la base de la epiglotis) | Tiroides |
| **Hígado** | Tráquea (como mínimo 2 secciones, 1 sección longitudinal que pase por la carina traqueal y 1 sección transversal) |
| **Pulmón** (todos los lóbulos en una sección de corte, incluidos los bronquios primarios) | [Vejiga urinaria] |
| Ganglios linfáticos de la región hiliar del pulmón, especialmente cuando se estudian sustancias problema particuladas escasamente solubles. Si se trata de exámenes más minuciosos o de carácter inmunológico, pueden tomarse en consideración otros ganglios linfáticos, por ejemplo de las regiones mediastínica, cervical/submandibular o auricular. | Útero |
| | Todas las lesiones macroscópicas |
| Tejidos nasofaríngeos [como mínimo 4 secciones; 1 sección incluirá el conducto nasofaríngeo y el tejido linfoide asociado a la nariz (Nasal Associated Lymphoid Tissue, NALT)] | |
| Esófago | |
| [Bulbo olfativo] | |
| Ovarios | |

▼M4

41. El pulmón se debe extraer intacto, pesar e instilar con un fijador apropiado a una presión de 20-30 cm de agua para asegurar el mantenimiento de la estructura pulmonar (5). Se preparan cortes de todos los lóbulos a un solo nivel, incluyendo los bronquios primarios, pero, si se practica un lavado pulmonar, el lóbulo no lavado se seccionará a tres niveles (no en cortes seriados).

42. Deben examinarse como mínimo 4 secciones de los tejidos nasofaríngeos, una de los cuales incluirá el conducto nasofaríngeo (5) (6) (7) (8) (9) para permitir una observación adecuada de los epitelios escamoso, transicional (respiratorio no ciliado) y olfativo, y el tejido de drenaje linfático [NALT; (10) (11)]. Se examinarán tres secciones de la laringe, una de las cuales debe incluir la base de la epiglotis (12). Deben examinarse como mínimo 2 secciones de la tráquea, entre ellas un corte longitudinal que pase por la carina de bifurcación de los bronquios extrapulmonares y un corte transversal.

EXAMEN HISTOPATOLÓGICO

43. La evaluación histopatológica de todos los órganos y tejidos mencionados en el cuadro 2 se llevará a cabo en el lote de control y en el de concentración más elevada, así como en todos los animales que mueran o sean sacrificados durante el estudio. Se prestará especial atención a las vías respiratorias, los órganos diana y las lesiones macroscópicas. Aquellos órganos y tejidos que presenten lesiones en el lote de concentración más elevada se examinarán en todos los grupos. Con objeto de demostrar una clara relación concentración-respuesta, el director del estudio puede decidir la realización de evaluaciones histopatológicas en otros grupos. Si se utiliza un lote satélite (reversibilidad), debe hacerse un examen histopatológico de todos los órganos y tejidos que presenten efectos en los lotes tratados. Si en el lote de exposición elevada se producen muertes prematuras u otras contrariedades que comprometan la interpretación de los datos, se practicarán evaluaciones histopatológicas en el lote de la concentración inmediatamente inferior. Se procurará correlacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

DATOS E INFORME

**Datos**

44. Se documentarán los datos de cada animal referentes a peso corporal, consumo de alimento, patología clínica, anatomía patológica macroscópica, peso de los órganos e histopatología. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada lote de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la autopsia. Todos los resultados, cuantitativos y fortuitos, se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido; los métodos estadísticos aplicados deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

**Informe del ensayo**

45. El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

*Animales de experimentación y zootecnia*

— Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.

▼M4

— Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata. Podrán indicarse la procedencia y los datos previos, siempre que correspondan a animales sometidos a condiciones parecidas de exposición, alojamiento y alimentación.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Método de asignación al azar.

— Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

*Sustancia problema*

— Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).

— Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

*Vehículo*

— Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).

— Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

*Cámara de inhalación*

— Descripción pormenorizada de la cámara de inhalación, incluido el volumen, y acompañada de un diagrama.

— Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.

— Instrumental empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

— Fuente del aire y sistema de acondicionamiento.

— Métodos de calibración del instrumental para garantizar una atmósfera experimental homogénea.

— Diferencia de presión (positiva o negativa).

— Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en la cámara (de cuerpo entero).

— Estabilidad de la atmósfera experimental.

— Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.

— Tratamiento del aire suministrado/extraído.

— Caudales de aire, caudal de aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).

— Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ($t_{95}$) en la cámara de inhalación.

— Número de variaciones de volumen por hora.

— Dispositivos de dosificación (si procede).

*Datos relativos a la exposición*

— Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.

▼M4

— Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).

— Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.

— Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, $mg/m^3$, etc.) y no en unidades de volumen (ppm, ppmm, etc.).

— Distribución granulométrica, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica ($\sigma_g$), incluidos los correspondientes métodos de cálculo. Se documentarán los análisis granulométricos individuales.

*Condiciones del ensayo*

— Pormenores de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de los sólidos o preparar soluciones de la sustancia problema.

— Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.

— Descripción pormenorizada del instrumental empleado para controlar la temperatura, la humedad y el caudal de aire de la cámara (creación de una curva de calibración).

— Descripción pormenorizada del equipo empleado para tomar las muestras con el fin de medir la concentración de la cámara y la distribución por tamaño de partícula.

— Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

— Método aleatorio de asignación de los animales a los lotes de exposición y de control (testigo).

— Pormenores sobre la calidad del alimento y del agua (incluido el tipo o procedencia de la alimentación y el origen del agua).

— Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

*Resultados*

— Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.

— Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

— Tabulación de los datos de granulometría, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y $\sigma_g$.

— Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).

▼M4

— Tabulación de los pesos de los animales individuales.

— Tabulación del consumo de alimentos.

— Tabulación de los datos de patología clínica.

— Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

— Tabulación de cualesquiera otros parámetros analizados.

*Evaluación e interpretación de los resultados*

— Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para satisfacer los criterios del presente método de ensayo como, por ejemplo, la concentración límite o el tamaño de partícula.

— Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.

— En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.

— Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

— Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre parámetros de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3).

— Se identificarán el órgano o los órganos diana.

— Se determinarán los valores de NOAEL y LOAEL.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

*Apéndice 1*

DEFINICIÓN

**Sustancia problema:** cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼B

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

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

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

#### 1.2. DEFINICIÓN

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

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ninguno.

#### 1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

##### 1.6.1. **Preparación**

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

##### 1.6.2. **Condiciones de ensayo**

###### 1.6.2.1. *Animales de laboratorio*

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

▼B

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

1.6.2.2. *Número y sexo*

Deben utilizarse al menos diez animales (5 hembras y 5 machos) de piel sana, para cada dosis. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. Si se van a sacrificar algunos animales durante el ensayo habrá que añadir la cantidad de animales que se haya previsto sacrificar. Además, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) con el nivel de dosis más elevado durante 28 días para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Se utiliza también un lote satélite de 10 animales testigo (5 de cada sexo).

1.6.2.3. *Dosis*

Se utilizan al menos tres dosis, así como un lote testigo y, en su caso, un lote testigo para el vehículo. El período mínimo de exposición será de 6 horas diarias. La sustancia de ensayo debe aplicarse todos los días a la misma hora y las dosis deben adaptarse semanalmente o bisemanalmente con objeto de conservar un nivel de dosis constante respecto al peso corporal de los animales. A excepción de la administración de las sustancias de ensayo, debe tratarse a los animales del lote testigo de la misma forma que a los de los lotes experimentales. Cuando para facilitar la administración se utilice un vehículo, este se administrará también al lote testigo, del vehículo en las mismas condiciones que a los lotes tratados; la dosis será la misma que se administre al grupo tratado con la dosis más elevada. La dosis más elevada debe producir efectos tóxicos que no originen la muerte de ningún animal (o solo de algunos). La dosis más baja no debe producir ningún efecto tóxico detectable. Si se dispone de una estimación aceptable sobre la exposición del hombre, la dosis más baja administrada debe superar este valor. En condiciones óptimas la dosis intermedia debe producir unos efectos tóxicos observables mínimos. Si se utilizan varias dosis intermedias, la diferencia entre ellas debe ser suficiente para producir una graduación de los efectos tóxicos. En los lotes correspondientes a dosis bajas o intermedias, así como en los lotes testigo, la mortalidad debe ser baja para que la evaluación de los resultados sea significativa.

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

1.6.2.4. *Prueba límite*

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

1.6.2.5. *Período de observación*

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

▼B

1.6.3. **Procedimiento**

Los animales deben estar alojados en jaulas individuales. En condiciones óptimas, la sustancia se administra a los animales todos los días, durante un período de 28 días. Los animales de todos los grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben mantenerse en observación 14 días más, sin tratamiento, para comprobar la curación o la persistencia de los efectos tóxicos. La duración mínima de la exposición debe ser de 6 horas diarias.

La sustancia debe aplicarse uniformemente sobre una superficie equivalente más o menos al 10 % de la superficie total corporal. Cuando se trata de sustancias altamente tóxicas, la superficie cubierta puede ser menor, pero procurando que al aplicar la sustancia se forme en toda la superficie una capa lo más fina y uniforme posible.

Durante la exposición, la sustancia se mantiene en contacto con la piel mediante un apósito de gasa porosa y un esparadrapo no irritante. Además, la superficie tratada debe estar convenientemente cubierta para mantener en su sitio el apósito de gasa y la sustancia e impedir que los animales puedan ingerir esta última. Pueden utilizarse aparatos de contención para impedir la ingestión de la sustancia, pero no se recomienda una inmovilización completa. Puede usarse un dispositivo protector en forma de collar como método alternativo.

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

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

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

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

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

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

▼B

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

1.6.4. **Autopsia general**

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

1.6.5. **Examen histopatológico**

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

2. **RESULTADOS**

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

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

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

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

— datos relativos a los animales (especie, cepa, origen, condiciones ambientales, régimen alimentario, etc.),

— condiciones de ensayo, (incluido el tipo de apósito: oclusivo o no oclusivo),

— dosis (en su caso, también el vehículo) y concentraciones,

— nivel que no produce ningún efecto, si es posible,

— respuesta tóxica por sexo y dosis,

— momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido,

— efectos tóxicos u otros,

— momento de observación de cualquier síntoma anormal y su evolución,

— cantidades de alimento y peso corporal,

— análisis hematológicos practicados y resultados,

▼B

— pruebas bioquímicas clínicas practicadas y resultados,

— resultados de la autopsia,

— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

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

4. **REFERENCIAS**

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

▼M7

## B.10. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN MAMÍFEROS *IN VITRO*

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE 473 (2016). Forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. Se ha elaborado un documento de la OCDE que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a dichas directrices de ensayo (1).

El ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* tiene por objeto detectar productos que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en células de mamífero en cultivo (2) (3) (4). Las aberraciones estructurales pueden ser cromosómicas o cromatídicas. Puede surgir poliploidía (incluida la endorreduplicación) en los ensayos de aberraciones cromosómicas *in vitro*. Si bien los anéugenos pueden inducir la aparición de poliploidía, esta por sí sola no indica potencial aneugénico y puede indicar simplemente perturbación del ciclo celular o citotoxicidad (5). Este ensayo no está diseñado para medir la aneuploidía. Para la detección de la aneuploidía se recomendaría un ensayo de micronúcleos *in vitro* (6).

El ensayo de aberraciones cromosómicas *in vitro* puede emplear cultivos de líneas celulares establecidas o cultivos de células primarias humanas o de roedores. Las células deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecimiento en cultivo, su estabilidad cariotípica (incluido el número de cromosomas) y su frecuencia de aberraciones cromosómicas espontáneas (7). Por el momento, los datos de que se dispone no permiten formular recomendaciones firmes pero sugieren que es importante, a la hora de evaluar los peligros químicos, examinar la situación de la proteína p53, la estabilidad genética (cariotipo), la capacidad de reparación del ADN y el origen (roedores frente a hombre) de las células elegidas para el ensayo. Se recomienda, pues, a los usuarios de este método de ensayo que consideren la influencia de estas y otras características de las células sobre el comportamiento de una línea celular en la detección de la inducción de aberraciones cromosómicas, ya que la situación de los conocimientos en este ámbito está evolucionando.

En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

Los ensayos realizados *in vitro* suelen exigir la utilización de una fuente exógena de activación metabólica, salvo que las células sean competentes metabólicamente respecto a los productos problema. El sistema exógeno de activación metabólica no reproduce completamente las condiciones *in vivo*. Deben evitarse las condiciones que puedan conducir a resultados positivos falsos, es decir, lesiones cromosómicas no causadas por la interacción directa entre los productos problema y los cromosomas; tales condiciones incluyen cambios en el pH o en la osmolalidad (8) (9) (10), la interacción con los componentes del medio (11) (12) o unos niveles excesivos de citotoxicidad (13) (14) (15) (16).

Este ensayo se emplea para detectar aberraciones cromosómicas que puedan producirse como consecuencia de sucesos clastogénicos. El análisis de la inducción de aberraciones cromosómicas debe efectuarse utilizando células en metafase. Por tanto, es esencial que las células estén en mitosis en los cultivos tanto tratados como sin tratar. En caso de nanomateriales fabricados, puede ser necesario recurrir a adaptaciones específicas del presente método de ensayo, pero estas no se describen aquí.

Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines reglamentarios, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la reglamentación impone el ensayo de la mezcla.

▼M7

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Los cultivos celulares de origen humano o de otros mamíferos se exponen al producto problema tanto con fuente exógena de activación metabólica como sin ella, salvo que se utilicen células con una capacidad adecuada de metabolización (véase el punto 13). A intervalos predeterminados apropiados tras el inicio de la exposición de los cultivos celulares al producto problema, se tratan estos con un producto que detenga la división celular en la metafase (p. ej., colcemid o colchicina), se recolectan, se tiñen y se analizan al microscopio las células en metafase para evaluar la presencia de aberraciones cromatídicas y cromosómicas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparación**

*Células*

Pueden utilizarse cultivos de diversas líneas celulares (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células de pulmón de hámster chino V79, células de pulmón de hámster chino (CHL)/IU, TK6) o de células primarias, incluidos los linfocitos de sangre periférica de hombre o de otros mamíferos (7). La elección de las líneas celulares debe justificarse científicamente. Cuando se utilizan células primarias, por razones de bienestar animal, debe considerarse la utilización de células primarias de origen humano, cuando sea viable y se hayan tomado de conformidad con los principios éticos humanos y la reglamentación. Los linfocitos de sangre periférica humana deben obtenerse de individuos jóvenes (aproximadamente de 18 a 35 años de edad), no fumadores, sin enfermedades conocidas ni exposiciones recientes a agentes genotóxicos (por ejemplo, productos, radiaciones ionizantes) a niveles que puedan aumentar la incidencia de fondo de las aberraciones cromosómicas. Esto garantizaría una incidencia de fondo de las aberraciones cromosómicas baja y constante. La incidencia de base de las aberraciones cromosómicas aumenta con la edad y esta tendencia es más pronunciada en las mujeres que en los varones (17) (18). Si se combinan células procedentes de más de un donante, debe especificarse el número de donantes. Es necesario demostrar que las células se han dividido entre el inicio de la administración del producto problema y la recolección de las células. Los cultivos celulares se mantienen en fase exponencial de crecimiento celular (líneas celulares) o se estimulan para que se dividan (cultivos primarios de linfocitos), a fin de exponer las células en diferentes fases del ciclo celular, ya que es posible que no se conozca la sensibilidad de las distintas fases celulares a los productos problema. Las células primarias que es preciso estimular con agentes mitogénicos para que se dividan dejan generalmente de estar sincronizadas durante la exposición al producto problema (por ejemplo, los linfocitos humanos tras una estimulación mitogénica de 48 horas). La utilización de células sincronizada durante el tratamiento no es recomendable, pero puede aceptarse si está justificada.

*Medios y condiciones de cultivo*

Para el mantenimiento de los cultivos deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (recipientes de cultivo, atmósfera humidificada con 5 % de $CO_2$ en su caso, temperatura de incubación de 37 °C). Las líneas celulares deben examinarse sistemáticamente para comprobar la estabilidad del número modal de cromosomas y la ausencia de contaminación por *Mycoplasma* (7) (19), y no deben utilizarse las células que se contaminen o que presenten un cambio en el número modal de cromosomas. Debe determinarse la duración del ciclo celular normal de las líneas celulares o cultivos primarios utilizados en el laboratorio de ensayo, y ser coherente con las características celulares publicadas (20).

*Preparación de los cultivos*

Líneas celulares: las células se propagan a partir de cultivos madre, se siembran en el medio de cultivo a una densidad tal que las células en suspensión o en monocapas sigan creciendo exponencialmente hasta el momento de la recolección (por ejemplo, debe evitarse la confluencia de las células cultivadas en monocapas).

▼M7

Linfocitos: se cultiva sangre completa tratada con anticoagulante (p. ej., heparina) o bien linfocitos separados (p.ej., durante 48 horas en el caso de los linfocitos humanos) en presencia de un mitógeno [p. ej., fitohemaglutinina (PHA) en el caso de los linfocitos humanos] a fin de inducir la división celular antes de la exposición al producto problema.

*Activación metabólica*

Se debe recurrir a sistemas exógenos de metabolización cuando se utilicen células con una capacidad metabólica endógena inadecuada. El sistema utilizado con más frecuencia que se recomienda por defecto, salvo en casos justificados, es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene a partir del hígado de roedores (generalmente ratas) tratados con inductores enzimáticos como el aroclor 1254 (21) (22) (23) o una combinación de fenobarbital y β-naftoflavona (24) (25) (26) (27) (28) (29). Esta última combinación no infringe el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (30), y se ha visto que es tan efectiva como el aroclor 1254 para inducir oxidasas de función mixta (24) (25) (26) (28). La fracción S9 se utiliza normalmente a concentraciones que varían entre el 1 y el 2 % (v/v), pero pueden aumentarse hasta el 10 % (v/v) en el medio de ensayo final. Debe evitarse durante el tratamiento el uso de productos que reduzcan el índice mitótico, especialmente productos que acomplejen el calcio (31). La elección del tipo y de la concentración del sistema exógeno de activación metabólica o del inductor metabólico utilizado puede estar influida por la clase de los productos que se someten a ensayo.

*Preparación del producto problema*

Los productos problema sólidos deben prepararse en disolventes adecuados y, si es conveniente, diluirse antes de tratar las células (véase el punto 23). Los productos problema líquidos pueden añadirse directamente al sistema de ensayo o diluirse antes del tratamiento del sistema de ensayo. Los productos problema gaseosos o volátiles deben someterse a ensayo aplicando modificaciones adecuadas a los protocolos normales, tales como el tratamiento en recipientes de cultivo sellados (32) (33) (34). La preparación del producto problema debe hacerse justo antes del tratamiento, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación.

**Condiciones del ensayo**

*Disolventes*

El disolvente debe elegirse para optimizar la solubilidad de los productos problema sin tener un impacto negativo en la realización del ensayo, por ejemplo por cambiar el crecimiento celular, afectar a la integridad del producto problema, reaccionar con los recipientes de cultivo, o interferir con el sistema de activación metabólica. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente (o medio de cultivo) acuoso. Son ejemplos de disolventes bien establecidos el agua o el dimetilsulfóxido. En general, los disolventes orgánicos no deben exceder del 1 % (v/v) y los disolventes acuosos (solución salina o agua) no deben superar el 10 % (v/v) en el medio de tratamiento final. Si se utilizan disolventes que no están bien establecidos (por ejemplo, etanol o acetona), debe disponerse de datos justificativos que indiquen su compatibilidad con el sistema de ensayo y los productos problema, y su ausencia de toxicidad genética a la concentración utilizada. En ausencia de estos datos justificativos, es importante incluir testigos sin tratar (véase el apéndice 1) para demostrar que el disolvente elegido no es nocivo ni tiene efectos clastogénicos.

*Medición de la proliferación celular y de la citotoxicidad, y selección de las concentraciones de tratamiento*

Al determinar la concentración máxima de producto problema, debe evitarse llegar a concentraciones que puedan producir respuestas positivas falsas, tales como las que provocan una citotoxicidad excesiva (véase el punto 22), precipitación en el medio de cultivo (véase el punto 23), o cambios marcados del pH o

▼M7

de la osmolalidad (véase el punto 5). Si el producto problema provoca un cambio marcado en el pH del medio en el momento de su adición, el pH puede ajustarse amortiguando el medio de tratamiento final para evitar resultados positivos falsos y mantener unas condiciones de cultivo adecuadas.

Se mide la proliferación celular para asegurarse de que las células tratadas han alcanzado la mitosis durante el ensayo en número suficiente y de que los tratamientos se efectúan a los niveles adecuados de citotoxicidad (véanse los puntos 18 y 22). La citotoxicidad se debe determinar con y sin activación metabólica en el experimento principal mediante un indicador adecuado de la muerte y el crecimiento de las células. Si bien la evaluación de la citotoxicidad en un ensayo inicial puede ser útil para definir mejor las concentraciones que deben utilizarse en el experimento principal, no es obligatorio efectuar un ensayo inicial. Si se lleva a cabo, no debe sustituir a la medición de la citotoxicidad en el experimento principal.

Para evaluar la citotoxicidad en los ensayos citogenéticos, puede recurrirse a la medición de la duplicación relativa de la población (DRP) o del aumento relativo del recuento celular (ARRC) (13) (15) (35) (36) (55) (véanse las fórmulas en el apéndice 2). En caso de tratamiento a largo plazo y de tiempos de recolección tras el inicio del tratamiento superiores a 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (es decir, más de 3 ciclos celulares en total), la DRP puede subestimar la citotoxicidad (37). En tales circunstancias, puede ser preferible medir el ARRC, o puede ser útil evaluar la citotoxicidad tras un tiempo igual a 1,5 veces la duración del ciclo celular normal utilizando la DRP.

En el caso de los linfocitos en cultivos primarios, si bien el índice mitótico (IM) es una medida de los efectos citotóxicos o citostáticos, se ve influido por el tiempo al que se mide después del tratamiento, por el mitógeno empleado y por la posible alteración del ciclo celular. No obstante, el IM es aceptable porque es posible que otras mediciones de la citotoxicidad resulten engorrosas y poco prácticas y no puedan aplicarse a la población objetivo de linfocitos que crecen en respuesta a la estimulación con PHA.

Si bien el ARRC y la DRP en el caso de las líneas celulares y el IM en el de los cultivos primarios de linfocitos son los parámetros de citotoxicidad recomendados, el uso de otros indicadores (por ejemplo, integridad de las células, apoptosis, necrosis, ciclo celular) podría proporcionar información adicional útil.

Deben evaluarse al menos tres concentraciones de ensayo (sin incluir los testigos positivos y de disolvente) que cumplan los criterios de aceptabilidad (citotoxicidad apropiada, número de células, etc.). Cualquiera que sea el tipo de células (líneas celulares o cultivos primarios de linfocitos), pueden utilizarse a cada concentración de ensayo cultivos tratados replicados o sin replicar. Si bien se recomienda el uso de cultivos duplicados, también son aceptables los cultivos sin replicar, siempre que se examine el mismo número total de células, sea en cultivos duplicados o sin replicar. La utilización de cultivos sin replicar es especialmente pertinente cuando se evalúan más de 3 concentraciones (véase el punto 31). Los resultados obtenidos en los cultivos replicados independientes a una concentración determinada se pueden poner en común para el análisis de los datos (38). En el caso de productos problema que muestren escasa o nula citotoxicidad, normalmente serán adecuados los intervalos de concentración de aproximadamente el doble o el triple. Cuando se produce citotoxicidad, las concentraciones de ensayo seleccionadas deben cubrir una gama a partir de la que provoca citotoxicidad según se describe en el punto 22, con inclusión en particular de las concentraciones a las que existe citotoxicidad moderada y débil o nula. Muchos productos problema presentan curvas de respuesta a la concentración de elevada pendiente y, con el fin de obtener datos a niveles bajos y

▼M7

moderados de citotoxicidad o de estudiar en detalle la relación entre dosis y respuesta, entonces es necesario recurrir a concentraciones más próximas entre sí o a más de tres concentraciones (cultivos replicados o sin replicar), en particular en situaciones en que se requiere una repetición del experimento (véase el punto 47).

Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, la concentración más elevada debe aspirar a provocar un 55 ± 5 % de citotoxicidad utilizando los parámetros recomendados de citotoxicidad (es decir, reducción del ARRC y de la DRP con líneas celulares y reducción del IM con cultivos primarios de linfocitos al 45 ± 5 % del testigo negativo en paralelo). Ha de tenerse cuidado al interpretar resultados positivos que solo se encuentren en el extremo superior de este intervalo de citotoxicidad del 55 ± 5 % (13).

Para los productos problema poco solubles que no son citotóxicos a concentraciones inferiores a la concentración mínima insoluble, la mayor concentración analizada debe producir turbidez o precipitado visibles a simple vista o con ayuda de un microscopio invertido al final del tratamiento con el producto problema. Incluso si se produce citotoxicidad por encima del límite de solubilidad, es aconsejable hacer el ensayo a una única concentración que produzca turbidez o precipitado visible porque este puede provocar efectos falsos. A la concentración que produce precipitado, se debe evitar que este interfiera con la realización del ensayo (por ejemplo, con la tinción o el examen celular). Puede ser útil determinar la solubilidad en el medio de cultivo antes de que efectuar el experimento.

Si no se observa precipitado ni citotoxicidad limitante, la concentración de ensayo más elevada debe corresponder a la más baja de las siguientes: 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml (39) (40) (41). Si el producto problema no tiene una composición definida y se trata, por ejemplo, de sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos (UVCB) (42), extractos medioambientales, etc., es posible que la concentración superior tenga que ser mayor (por ejemplo, 5 mg/ml), en ausencia de citotoxicidad suficiente, para aumentar la concentración de cada uno de los componentes. Conviene señalar, no obstante, que estos requisitos pueden variar en caso de medicamentos de uso humano (43).

*Testigos*

Se incluirán, para cada período de recolección, testigos negativos en paralelo (véase el punto 15), consistentes en el disolvente solo en el medio de tratamiento y sometidos al mismo proceso que los cultivos del ensayo.

Es necesario disponer testigos positivos en paralelo a fin de demostrar la capacidad del laboratorio para detectar clastógenos en las condiciones establecidas en el protocolo de ensayo utilizado y la efectividad del sistema exógeno de activación metabólica, si procede. En el cuadro 1 a continuación se encuentran ejemplos de testigos positivos. Es posible utilizar como testigos positivos otros productos, si se justifica. Dado que los ensayos de toxicidad genética con células de mamífero *in vitro* están suficientemente normalizados, el uso de testigos positivos puede limitarse a un clastógeno que requiera activación metabólica. Siempre que se utilice de forma paralela al ensayo sin activación con la misma duración del tratamiento, la respuesta de este único testigo positivo demostrará tanto la actividad del sistema de activación metabólica como la capacidad de respuesta del sistema de ensayo. No obstante, los tratamiento a largo plazo (sin fracción S9) deben tener su propio testigo positivo, ya que la duración del tratamiento será diferente de la del ensayo con activación metabólica. Cada testigo positivo debe utilizarse a una o varias concentraciones de las que quepa esperar que produzcan incrementos reproducibles y detectables respecto a los valores de fondo para demostrar la sensibilidad del sistema de ensayo (es decir, que los efectos sean claros, pero sin revelar inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados), y la respuesta no debe verse comprometida por una citotoxicidad que exceda de los límites especificados en el método de ensayo.

▼M7

*Cuadro 1.*

**Productos de referencia recomendados para evaluar la competencia del laboratorio, y para la selección de los testigos positivos.**

| Categoría | Producto | CAS RN |
|---|---|---|
| 1. Clastógenos activos sin activación metabólica | | |
| | Metanosulfonato de metilo | 66-27-3 |
| | Mitomicina C | 50-07-7 |
| | N-Óxido de 4-nitroquinolina | 56-57-5 |
| | Arabinósido de citosina | 147-94-4 |
| 2. Clastógenos que necesitan activación metabólica | | |
| | Benzo(a)pireno | 50-32-8 |
| | Ciclofosfamida | 50-18-0 |

PROCEDIMIENTO

**Tratamiento con el producto problema**

Se tratan células en crecimiento con el producto problema en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica.

**Momento de recolección del cultivo**

Para una evaluación a fondo, que sería necesaria para deducir un resultado negativo, deben aplicarse las tres condiciones experimentales siguientes, utilizando un tratamiento a corto plazo con y sin activación metabólica y un tratamiento a largo plazo sin activación metabólica (véanse los puntos 43, 44 y 45):

— Las células deben exponerse al producto problema sin activación metabólica durante 3 a 6 horas, y recolectarse cuando haya transcurrido un período de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal desde el inicio del tratamiento (18).

— Las células deben exponerse al producto problema con activación metabólica durante 3 a 6 horas, y recolectarse cuando haya transcurrido un período de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal desde el inicio del tratamiento (18).

— Las células deben exponerse continuamente sin activación metabólica hasta la recolección tras un período de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal. Determinados productos (por ejemplo, análogos de nucleósidos) pueden detectarse mejor con un tiempo de tratamiento y recolección superior a 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (24).

En caso de que alguna de las anteriores condiciones experimentales conduzca a una respuesta positiva, puede no ser necesario investigar los otros regímenes de tratamiento.

**Preparación de los cromosomas**

Se tratan los cultivos celulares con colcemid o colchicina, por lo general durante un período de 1 a 3 horas antes de la recolección. Los cultivos celulares se recolectan y procesan por separado para preparar los cromosomas. Esta preparación incluye el tratamiento hipotónico de las células, y su fijación y tinción. En las monocapas, es posible que haya células mitóticas (identificables por su forma

▼M7

redondeada y por despegarse de la superficie) al final del tratamiento de 3-6 horas. Como estas células mitóticas se despegan con facilidad, pueden perderse cuando se retira el medio que contiene el producto problema. Si hay pruebas de un aumento sustancial del número de células mitóticas en comparación con los testigos, lo que indica una probable detención mitótica, las células deben recogerse por centrifugación y volver a añadirse a los cultivos, para evitar la pérdida de células que estén en mitosis, y que podrían presentar aberraciones cromosómicas, en el momento de la recolección.

**Análisis**

Todos los portaobjetos, incluidos los de los testigos positivos y negativos, deben codificarse de forma independiente antes de su análisis microscópico para detectar aberraciones cromosómicas. Dado que los métodos de fijación provocan con frecuencia que una parte de las células en metafase pierdan cromosomas, las células examinadas deben contener un número de centrómeros igual al número modal ± 2.

Deben examinarse al menos 300 metafases bien extendidas de cada concentración y testigo para concluir que un producto problema es claramente negativo (véase el punto 45). Las 300 células deben repartirse a partes iguales entre las réplicas, cuando se utilizan cultivos replicados. Cuando se utiliza un solo cultivo sin replicar por concentración (véase el punto 21), deben examinarse al menos 300 metafases bien extendidas en este cultivo único. El examen de 300 células tiene la ventaja de aumentar la potencia estadística del ensayo y, además, será poco probable que se observen valores nulos (se espera que sean solo el 5 %) (44). El número de metafases examinadas puede reducirse cuando se observe un elevado número de células con aberraciones cromosómicas y el producto problema se considere claramente positivo.

Deben examinarse células con aberraciones cromosómicas estructurales, contando tanto con las separaciones (*gaps*) como sin ellas. Las roturas y separaciones se definen en el apéndice 1 de conformidad con (45) (46). Las aberraciones cromosómicas y las cromatídicas deben registrarse por separado y clasificarse en subtipos (roturas, intercambios). Los procedimientos seguidos en el laboratorio deben garantizar que el análisis de las aberraciones cromosómicas es realizado por examinadores bien formados y es objeto de una revisión por pares, si procede.

Pese a que el objeto del ensayo consiste en detectar aberraciones cromosómicas estructurales, es importante registrar las frecuencias de la poliploidía y de la endorreduplicación cuando se dan estos fenómenos (véase el punto 2).

**Competencia del laboratorio**

Con el fin de conseguir la suficiente experiencia con el ensayo antes de utilizarlo en ensayos sistemáticos, el laboratorio debe haber efectuado una serie de experimentos con productos positivos de referencia que actúen a través de diferentes mecanismos y con diversos testigos negativos (con diversos disolventes o vehículos). Las respuestas obtenidas con estos testigos positivos y negativos deben ser coherentes con la bibliografía. Esto no es aplicable a los laboratorios que tienen experiencia, esto es, que disponen de una base de datos históricos, según se define en el punto 37.

Debe investigarse una selección de productos testigo positivos (véase el cuadro 1 en el punto 26) con tratamientos cortos y largos en ausencia de activación metabólica, y también con tratamientos cortos en presencia de activación metabólica, para demostrar su capacidad de detectar productos clastogénicos y determinar la efectividad del sistema de activación metabólica. Debe elegirse una gama de concentraciones de los productos seleccionados de forma que produzcan aumentos sobre el nivel de fondo relacionados con la concentración y reproducibles para demostrar la sensibilidad y el intervalo dinámico del sistema de ensayo.

▼M7

**Datos sobre testigos históricos**

El laboratorio debe determinar:

— un intervalo y una distribución de los testigos positivos históricos,

— un intervalo y una distribución de los testigos negativos (sin tratar, disolventes) históricos.

Cuando se obtengan datos por primera vez en relación con la distribución de testigos negativos históricos, los testigos negativos en paralelo deben ser coherentes con los datos publicados de los testigos, si existen. Según se añadan más datos experimentales sobre la distribución de los testigos, los testigos negativos en paralelo deben situarse idealmente dentro de los límites de control del 95 % de dicha distribución (44) (47). La base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio debe constituirse en un principio con un mínimo de 10 experimentos, pero preferiblemente con al menos 20 experimentos realizados en condiciones experimentales comparables. Los laboratorios deben utilizar métodos de control de calidad, como gráficos de control [por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (48)], con el fin de determinar la variabilidad de sus datos sobre los testigos positivos y negativos, y de demostrar que la metodología está «controlada» en su laboratorio (44). En la bibliografía pueden encontrarse más recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (es decir, criterios de inclusión y exclusión de datos en los datos históricos y criterios de aceptabilidad para un determinado experimento) (47).

Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de su coherencia con las bases de datos de testigos históricos existentes del laboratorio. Cualquier incoherencia importante debería dar lugar a la creación de una nueva base de datos de testigos históricos.

Los datos sobre los testigos negativos deben consistir en la incidencia de células con aberraciones cromosómicas procedentes de un solo cultivo o de la suma de cultivos replicados como se describe en el punto 21. Lo ideal sería que los testigos negativos en paralelo estuvieran dentro de los límites de control del 95 % de la distribución de la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio (44) (47). Cuando hay datos de los testigos negativos en paralelo que quedan fuera de los límites de control del 95 %, su inclusión en la distribución de testigos históricos puede ser aceptable en la medida en que dichos datos no sean valores extremos y haya pruebas de que el sistema de ensayo está «controlado» (véase el punto 37) y pruebas de la ausencia de fallos técnicos o humanos.

DATOS E INFORME

**Presentación de los resultados**

Debe evaluarse el porcentaje de células que presentan aberraciones cromosómicas estructurales. Las aberraciones cromosómicas y cromatídicas, clasificadas por subtipos (roturas, intercambios), deben enumerarse por separado con su número y frecuencia en relación con los cultivos experimentales y testigos. Las separaciones se registran y se recogen en el informe aparte, pero por lo general no se incluyen en la frecuencia total de aberraciones. Se recoge en el informe el porcentaje de poliploidía o de células endorreduplicadas, cuando se observan.

Asimismo, deben registrarse las determinaciones de citotoxicidad realizadas en paralelo en todos los cultivos tratados y en los testigos positivos y negativos de los experimentos principales sobre aberraciones.

Deben proporcionarse datos de cada cultivo. Además, se resumirán todos los datos en forma de cuadro.

**Criterios de aceptabilidad**

La aceptabilidad de un ensayo se basa en los criterios siguientes:

— El testigo negativo en paralelo se considera aceptable para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio de acuerdo con lo descrito en el punto 39.

▼M7

— Los testigos positivos en paralelo (véase el punto 26) deben inducir respuestas compatibles con las obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo.

— Deben cumplirse los criterios de proliferación celular en el testigo del disolvente (puntos 17 y 18).

— Se han sometido a ensayo las tres condiciones experimentales, a menos que una haya dado lugar a resultados positivos (véase el punto 28).

— Es analizable un número apropiado de células y de concentraciones (puntos 31 y 21).

— Los criterios de selección de la concentración superior son coherentes con los descritas en los puntos 22, 23 y 24.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si, en alguna de las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 28):

a) al menos una de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

b) el aumento está relacionado con la dosis cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

c) alguno de los resultados está fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 39).

Cuando se cumplen todos estos criterios, el producto problema se considera capaz de inducir aberraciones cromosómicas en las células de mamífero cultivadas en este sistema de ensayo. En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (49) (50) (51).

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 28):

a) ninguna de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

b) no hay ningún aumento relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

c) todos los resultados están dentro de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 39).

el producto problema se considera entonces incapaz de inducir aberraciones cromosómicas en las células de mamífero cultivadas en este sistema de ensayo.

No se requiere ninguna verificación de una respuesta claramente positiva o negativa.

En caso de que la respuesta no sea ni claramente positiva ni claramente negativa como se describe más arriba, o a fin de ayudar a determinar la relevancia biológica de un resultado, los datos deben ser evaluados por expertos o mediante más investigaciones. Puede ser útil examinar células adicionales (en su caso) o realizar una repetición del experimento modificando las condiciones experimentales, como, por ejemplo, la separación entre concentraciones u otras condiciones de activación metabólica (es decir, concentración u origen de la fracción S9).

En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos puede no permitir que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo, por lo que la respuesta del producto problema se considerará dudosa.

▼M7

El aumento del número de células poliploides puede indicar que los productos problema son capaces de inhibir procesos mitóticos y de producir aberraciones cromosómicas numéricas (52). El aumento del número de células con cromosomas endorreduplicados puede indicar que los productos problema tienen la capacidad de inhibir el progreso del ciclo celular (53) (54) (véase el punto 2). Por consiguiente, deben consignarse por separado la incidencia de células poliploides y la de células con cromosomas endorreduplicados.

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

— estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

— medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

*Sustancia con un solo componente:*

— aspecto físico, hidrosolubilidad, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.

*Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas:*

— en la medida de lo posible, caracterizadas por la identidad química (véase más arriba), presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes.

*Disolvente:*

— justificación de la elección del disolvente;

— también debe indicarse el porcentaje de disolvente en el medio de cultivo final.

*Células:*

— tipo y origen de las células;

— características del cariotipo e idoneidad del tipo de células empleadas;

— ausencia de micoplasmas, en el caso de las líneas celulares;

— en el caso de las líneas celulares, información sobre la duración del ciclo celular, tiempo de duplicación o índice de proliferación;

— sexo de los donantes de sangre, edad y cualquier información pertinente sobre los donantes, sangre completa o linfocitos aislados y mitógeno empleado;

— número de pases, si se conoce, en el caso de las líneas celulares;

— métodos de mantenimiento de los cultivos celulares, en el caso de las líneas celulares;

— número modal de cromosomas, en el caso de las líneas celulares.

▼M7

*Condiciones de ensayo:*

— identidad del producto que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración de la exposición de las células;

— concentración del producto problema, expresada como concentración final en el medio de cultivo (por ejemplo, mM o μg o mg/ml de medio de cultivo);

— fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos con inclusión, p. ej., de datos relativos a la citotoxicidad y límites de solubilidad;

— composición de los medios, concentración de $CO_2$ si procede, nivel de humedad;

— concentración (o volumen) del disolvente y del producto problema añadidos al medio de cultivo;

— temperatura de incubación;

— tiempo de incubación;

— duración del tratamiento;

— momento de la recolección tras el tratamiento;

— densidad celular en el momento de la siembra, si procede;

— tipo y composición del sistema de activación metabólica (origen de la fracción S9, método de preparación de la mezcla S9, concentración o volumen de mezcla S9 y de fracción S9 en el medio de cultivo final, controles de calidad de la fracción S9);

— productos testigos positivo y negativo, concentraciones finales en cada una de las condiciones de tratamiento;

— métodos de preparación de los portaobjetos y técnica de tinción utilizados;

— criterios de aceptabilidad de los ensayos;

— criterios de examen de las aberraciones;

— número de metafases analizadas;

— métodos de medición de la citotoxicidad;

— cualquier información adicional relativa a la citotoxicidad y método utilizado;

— criterios empleados para considerar si los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos;

— métodos utilizados para determinar el pH, la osmolalidad y la precipitación.

*Resultados:*

— número de células tratadas y número de células recolectadas de cada cultivo cuando se utilizan líneas celulares;

— mediciones de la citotoxicidad como, por ejemplo, ARRC, DRP, IM u otras observaciones, en su caso;

— información sobre la duración del ciclo celular, tiempo de duplicación o índice de proliferación en el caso de las líneas celulares;

— signos de precipitación y momento de la determinación;

▼M7

— definición de las aberraciones, incluidas las separaciones;

— número de células examinadas, número de células con aberraciones cromosómicas y tipo de aberraciones cromosómicas por separado para cada cultivo tratado y testigo, tanto con las separaciones como sin ellas;

— variaciones de la ploidía (células poliploides y células con cromosomas endorreduplicados, indicadas por separado), en su caso;

— relación concentración-respuesta, cuando sea posible;

— datos de los testigos negativos (disolvente) y positivos (concentraciones y disolventes) en paralelo;

— datos históricos de los testigos negativos (disolvente) y positivos, con intervalos, medias y desviaciones típicas y límites de control del 95 % para la distribución, así como el número de datos;

— análisis estadístico; valores p, si se dispone de ellos.

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones*

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Evans, H.J. (1976), «Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens», in *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection*, Vol. 4, Hollaender, A. (ed.), Plenum Press, New York and London, pp. 1-29

(3) Ishidate, M. Jr., Sofuni, T. (1985), «The In Vítro Chromosomal Aberration Test Using Chínese Hams ter Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture» en Progress in Mutation Research, Vol. 5. Ashby, J. et al. (eds.) Elsevier Science Publishers, Amsterdam-New York- Oxford, pp. 427-432.

(4) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosomal aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(5) Muehlbauer, P.A. *et al*. (2008), «Improving dose selection and identification of aneugens» in the *in vitro* chromosome aberration test by integration of flow cytometry-based methods, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/4, pp. 318-327.

(6) Capítulo B.49 del presente anexo: Ensayo de micronúcleos en células de mamífero *in vitro*.

(7) ILSI paper (draft), Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, F. Darroudi, M. Honma, A. Czich, J van Benthem, S. Galloway, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, D.J. Kirkland, Recommendations for good cell culture practices in genotoxicity testing.

(8) Scott, D. *et al*. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, Vol.257/2, pp. 147-204.

(9) Morita, T. *et al*. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 268/2, pp. 297-305.

(10) Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environmental and Molecular Mutagen*esis, Vol. 8/6, pp. 789-886.

▼**M7**

(11) Long, L.H. *et al*. (2007), Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(12) Nesslany, F. *et al*. (2008), Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 49/6, pp. 439-452.

(13) Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 191-201.

(14) Kirkland, D. *et al*. (2005), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens. I: Sensitivity, specificity and relative predictivity, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 584/1-2, pp. 1–256.

(15) Greenwood, S. *et al*. (2004), Population doubling: a simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 43/1, pp. 36–44.

(16) Hilliard, C.A. *et al*. (1998), Chromosome aberrations *in vitro* related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 31/4, pp. 316–326.

(17) Hedner K. *et al*. (1982), Sister chromatid exchanges and structural chromosomal aberrations in relation to age and sex, *Human Genetics*, Vol. 62, pp. 305-309.

(18) Ramsey M.J. *et al*. (1995), The effects of age and lifestyle factors on the accumulation of cytogenetic damage as measured by chromosome painting, *Mutation Research*, Vol. 338, pp. 95-106.

(19) Coecke S. *et al*. (2005), Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, *ATLA*, Vol. 33/3, pp. 261-287.

(20) Henderson, L. *et al*. (1997), Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies, *Mutagenesis*, Vol.12/3, pp.163-167.

(21) Ames, B.N., J. McCann, E. Yamasaki (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 31/6, pp. 347-363.

(22) Maron, D.M., B.N. Ames (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(23) Natarajan, A.T. *et al*. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res*earch, Vol. 37/1, pp. 83-90.

(24) Matsuoka, A., M. Hayashi, M. Jr. Ishidate (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in vitro*, *Mutation Research/ Genetic Toxicology*, Vol. 66/3, pp. 277-290.

(25) Ong, T.-m. *et al*. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

(26) Elliot, B.M. *et al*. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, Vol. 7/3, pp. 175-177.

▼**M7**

(27) Matsushima, T. *et al*. (1976), «A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, de Serres, F.J. *et al*. (eds.), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(28) Galloway, S.M. *et al*. (1994). Report from Working Group on *in vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, Vol. 312/3, pp. 241-261.

(29) Johnson, T.E., D.R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28/1, pp. 51-59.

(30) PNUMA (2001), Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Disponible en la dirección: http://www.pops.int/.

(31) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987), Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes, *Mutation Research*, Vol. 190/3, pp. 225-8.

(32) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982), «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in *Genotoxic Effects of Airborne Agents*, Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(33) Zamora, P.O. *et al*. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(34) Asakura, M. *et al*. (2008), An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(35) Lorge, E. *et al*. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(36) Galloway, S. *et al*. (2011), Workshop summary: Top concentration for *in vitro* mammalian cell genotoxicity assays; and Report from working group on toxicity measures and top concentration for *in vitro* cytogenetics assays (chromosome aberrations and micronucleus), *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 77-83.

(37) Honma, M. (2011), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Vol. 724/1-2, pp. 86-87.

(38) Richardson, C. *et al*. (1989), *Analysis of Data from In Vitro Cytogenetic Assays. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(39) OCDE (2014), Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487) ENV/JM/TG(2014)17. Disponible previa petición.

(40) Morita, T., M. Honma, K. Morikawa (2012), Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity, *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 741/1-2, pp. 32-56.

(41) Brookmire, L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013), Evaluation of the Highest Concentrations Used in the In Vitro Chromosome Aberrations Assay, *Environmental and Molecular Muagenesis,* Vol. 54/1, pp. 36-43.

▼M7

(42) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011), Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances, http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(43) USFDA (2012), International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponible en la dirección: https://federalregister.gov/a/2012-13774.

(44) OCDE (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

(45) ISCN (2013), *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*, Schaffer, L.G., J. MacGowan-Gordon, M. Schmid (eds.), Karger Publishers Inc., Connecticut.

(46) Scott, D. *et al*. (1990), «Metaphase chromosome aberration assays *in vitro*», in *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Recommended Procedures*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 62-86.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control Data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York.

(49) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003), *Statistical Methods for Rates and Proportions*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

(50) Galloway, S.M. *et al*. (1987), Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

(51) Richardson, C. *et al*. (1989), «Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays», in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(52) Warr, T.J., E.M. Parry, J.M. Parry (1993), A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens, *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 29-46.

(53) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Research*, Vol. 119/3, pp. 403-413.

(54) Huang, Y., C. Change, J.E. Trosko (1983), Aphidicolin — induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Research*, Vol. 43/3, pp. 1362-1364.

(55) Soper, K.A., S.M. Galloway (1994), Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test, *Mutation Res*earch, Vol. 312, pp. 139-149.

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Aneuploidía**: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas que afecta a uno o varios cromosomas, pero no a dotaciones completas de cromosomas (poliploidía).

**Apoptosis**: Muerte celular programada, caracterizada por una serie de fases que llevan a la desintegración de las células para formar partículas limitadas por membranas que se eliminan a continuación por fagocitosis o por liberación.

**Proliferación celular**: Aumento del número de células como resultado de divisiones celulares mitóticas.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Rotura cromatídica**: Discontinuidad de una sola cromátida en la que existe una alteración clara de la alineación de una de las cromátidas.

**Separación (*gap*) cromatídica**: Región sin teñir (lesión acromática) de una sola cromátida en la que existe una alteración mínima de la alineación de la cromátida.

**Aberración de tipo cromátida**: Lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de cromátidas solas o en la rotura y reunión entre cromátidas.

**Aberración de tipo cromosoma**: Lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura, o en la rotura y reunión, de ambas cromátidas en el mismo sitio.

**Clastógeno**: Producto que provoca aberraciones cromosómicas estructurales en poblaciones de células u organismos eucarióticos.

**Concentraciones**: Se refiere a las concentraciones del producto problema en el medio de cultivo.

**Citotoxicidad**: Para los ensayos contemplados en este método de ensayo que emplean líneas celulares, la citotoxicidad se identifica como una reducción de la duplicación relativa de la población (DRP) o del aumento relativo del recuento de células (ARRC) de las células tratadas en comparación con el testigo negativo (véanse el punto 17 y el apéndice 2). Para los ensayos contemplados en este método de ensayo que emplean cultivos primarios de linfocitos, la citotoxicidad se identifica como una reducción del índice mitótico de las células tratadas en comparación con el testigo negativo (véanse el punto 18 y el apéndice 2).

**Endorreduplicación**: Proceso en el que, tras una fase S de replicación del ADN, el núcleo no pasa a la mitosis sino que inicia otra fase S. El resultado son cromosomas con 4, 8, 16, etc. cromátidas.

**Genotoxicidad**: Término general que engloba todos los tipos de lesión del ADN o de los cromosomas, con inclusión de roturas, deleciones, adiciones, modificaciones y uniones de nucleótidos, reorganizaciones, mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en lesiones cromosómicas estables.

**Índice mitótico (IM)**: Relación entre el número de células en metafase y el número total de células observadas en una población celular; indica el grado de proliferación de dicha población.

**Mitosis**: División del núcleo celular, generalmente compuesta por profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

**Mutágeno**: Agente que provoca un cambio hereditario en una o varias secuencias de pares de bases del ADN en los genes o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).

▼M7

**Aberración numérica**: Cambio del número de cromosomas respecto al número normal característico de las células empleadas.

**Poliploidía**: Aberraciones cromosómicas numéricas en células u organismos que afectan a una o varias dotaciones completas de cromosomas, frente a las aberraciones que afectan solo a cromosomas sueltos (aneuploidía).

**Situación de la proteína p53**: La proteína p53 participa en la regulación del ciclo celular, en la apoptosis y en la reparación del ADN. Las células deficientes en proteína p53 funcional, incapaces de detener el ciclo celular o de eliminar las células dañadas por apoptosis u otros mecanismos (por ejemplo, inducción de la reparación del ADN) en relación con funciones de la proteína p53 en respuesta a las lesiones del ADN, deben estar, en teoría, más expuestas a las mutaciones génicas o a las aberraciones cromosómicas.

**Aumento relativo del recuento celular (ARRC)**: Aumento del número de células en los cultivos expuestos a los productos frente al aumento en cultivos no tratados, coeficiente expresado en porcentaje.

**Duplicación relativa de la población (DRP)**: Aumento del número de duplicaciones de la población en los cultivos expuestos a los productos frente al aumento en cultivos no tratados, coeficiente expresado en porcentaje.

**Fracción hepática S9**: Sobrenadante de homogeneizado de hígado después de centrifugación a 9 000 g, es decir, extracto de hígado crudo.

**Mezcla S9**: Mezcla de la fracción hepática S9 y de cofactores necesarios para la actividad metabólica de las enzimas.

**Testigo del disolvente**: Término general para definir los cultivos testigo que reciben solo el disolvente utilizado para disolver el producto problema.

**Aberración estructural**: Cambio de la estructura cromosómica detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular, observado como deleciones y fragmentaciones, intracambios o intercambios.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Testigos sin tratar**: Cultivos que no reciben tratamiento (es decir, ni producto problema ni disolvente), pero que se someten al mismo proceso en paralelo que los cultivos que reciben el producto problema.

▼M7

*Apéndice 2*

## FÓRMULAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD

**Índice mitótico (IM):**

$$\mathbf{IM}(\%) = \frac{\text{Número de células mitóticas}}{\text{Número total de células examinadas}} \times 100$$

**Aumento relativo del recuento celular (ARRC) o duplicación relativa de la población (DRP)** (se recomiendan ambos parámetros, ya que tienen en cuenta la proporción de la población celular que se ha dividido):

$$\mathbf{ARRC}(\%) = \frac{(\text{Aumento del número de células en los cultivos tratados}(\text{final} - \text{inicio}))}{(\text{Aumento del número de células en los cultivos testigo}(\text{final} - \text{inicio}))} \times 100$$

$$\mathbf{DRP}(\%) = \frac{(\text{N.º de duplicaciones de la población en los cultivos tratados})}{(\text{N.º de duplicaciones de la población en los cultivos testigo})} \times 100$$

donde:

**N.º de duplicaciones de la población** = [log (número de células tras el tratamiento ÷ número de células al inicio)] ÷ log 2

Por ejemplo, un ARRC o una DRP del 53 % indica un 47 % de citotoxicidad o citostasis y un 55 % de citotoxicidad o citostasis medido por el IM significa que el IM real es el 45 % del testigo.

En cualquier caso, debe medirse el número de células antes de tratamiento, de la misma forma que con los cultivos testigos tratados y negativos.

Si bien el recuento celular relativo (RCR, número de células en los cultivos tratados dividido por el número de células en los cultivos testigo) se había utilizado como parámetro de citotoxicidad en el pasado, ya no se recomienda porque puede subestimar la citotoxicidad.

En los cultivos testigos negativos, la duplicación de la población debe ser compatible con el requisito de recolectar las células después del tratamiento al cabo de un período igual a aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal y el índice mitótico debe ser lo bastante elevado para obtener un número suficiente de células en mitosis y poder calcular de forma fiable una reducción del 50 %.

▼M7

## B.11. ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN MÉDULA ÓSEA DE MAMÍFERO

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE 475 (2016). Forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. Se ha elaborado un documento de la OCDE que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a dichas directrices de ensayo (1).

El ensayo de aberraciones cromosómicas en médula ósea de mamíferos *in vivo* es especialmente relevante para la genotoxicidad porque, aunque pueden variar según la especie, los factores de los procesos del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de la reparación del ADN están activos y contribuyen a las respuestas. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de la genotoxicidad detectada en un sistema *in vitro*.

El ensayo de aberraciones cromosómicas en mamíferos *in vivo* se realiza para detectar aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por los productos problema en células de médula ósea de animales, por lo general roedores (2) (3) (4) (5). Las aberraciones cromosómicas estructurales pueden ser de tipo cromosoma o de tipo cromátida. Si bien la mayoría de las aberraciones provocadas por productos genotóxicos son de tipo cromátida, también pueden producirse aberraciones de tipo cromosoma. Las lesiones cromosómicas y los efectos relacionados ocasionan numerosas enfermedades genéticas humanas y hay pruebas de peso de que, cuando estas lesiones y efectos relacionados provocan alteraciones en los oncogenes y en los genes supresores de tumores, tienen relación con el cáncer en los seres humanos y en sistemas experimentales. Puede surgir poliploidía (incluida la endorreduplicación) en los ensayos de aberraciones cromosómicas *in vivo*. No obstante, un aumento en la poliploidía no indica por sí solo que haya potencial aneugénico y puede indicar simplemente perturbación del ciclo celular o citotoxicidad. Este ensayo no está diseñado para medir la aneuploidía. Para la detección de la aneuploidía se recomiendan como ensayos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, el ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamífero *in vivo* (capítulo B.12 del presente anexo) o el ensayo de micronúcleos en células de mamífero *in vitro* (método B.49 del presente anexo).

En el apéndice 1 se dan las definiciones de la terminología utilizada.

### CONSIDERACIONES INICIALES

En este ensayo se utilizan habitualmente roedores, pero en algunos casos pueden ser adecuadas otras especies, si está justificado científicamente. El tejido diana es la médula ósea por estar muy vascularizada y por contener una población de células de ciclo corto que pueden aislarse y tratarse con facilidad. La justificación científica para la utilización de especies distintas de las ratas y los ratones debe facilitarse en el informe. Si se utilizan especies que no sean de roedores, se recomienda que la medición de aberraciones cromosómicas en la médula ósea se integre en otro ensayo adecuado de toxicidad.

Si hay pruebas de que el producto o productos problema, o alguno o algunos de sus metabolitos, no llegan al tejido diana, puede no proceder la realización del presente ensayo.

Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines reglamentarios, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la reglamentación impone el ensayo de la mezcla.

▼M7

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se exponen los animales al producto problema por una vía adecuada y se sacrifican de forma compasiva, en un momento adecuado después del tratamiento. Antes de sacrificarlos, se tratan con un agente que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o colcemid). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células de la médula ósea y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromosómicas.

VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO

**Investigaciones de competencia**

A fin de establecer que posee la suficiente experiencia con la realización del ensayo antes de utilizarlo para hacer ensayos sistemáticos, el laboratorio debe haber demostrado su capacidad de reproducir los resultados previstos a partir de los datos publicados (por ejemplo, (6)) en cuanto a frecuencias de las aberraciones cromosómicas con un mínimo de dos productos como testigo positivo (incluidas las respuestas débiles inducidas por dosis bajas de los testigos positivos), como las que figuran en el cuadro 1 y con testigos de disolvente/vehículo compatibles (véase el punto 22). Estos experimentos deben utilizar dosis que den aumentos relacionados con la dosis y reproducibles, y demostrar la sensibilidad y el intervalo dinámico del sistema de ensayo en el tejido de interés (médula ósea), empleando el método de examen utilizado en el laboratorio. Este requisito no es aplicable a los laboratorios que tienen experiencia, esto es, que disponen de una base de datos históricos, según se define en los puntos 10-14.

**Datos sobre testigos históricos**

En el transcurso de las investigaciones de competencia, el laboratorio debe demostrar:

— un intervalo y una distribución de los testigos positivos históricos, y

— un intervalo y una distribución de los testigos negativos históricos.

Cuando se obtengan datos por primera vez en relación con la distribución de testigos negativos históricos, los testigos negativos en paralelo deben ser coherentes con los datos publicados de los testigos, si existen. Según se añadan más datos experimentales sobre la distribución de los testigos históricos, los testigos negativos en paralelo deben situarse idealmente dentro de los límites de control del 95 % de dicha distribución. La base de datos históricos del laboratorio de testigos negativos debe ser estadísticamente sólida para garantizar la capacidad del laboratorio de evaluar la distribución de sus datos sobre los testigos negativos. La bibliografía sugiere que puede ser necesario un mínimo de 10 experimentos, pero que sería preferible contar con al menos 20 experimentos realizados en condiciones experimentales comparables. Los laboratorios deben utilizar métodos de control de calidad, como gráficos de control (por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (7)), con el fin de determinar la variabilidad de sus datos y de demostrar que la metodología está «controlada» en su laboratorio. En la bibliografía pueden encontrarse más recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (es decir, criterios de inclusión y exclusión de datos en los datos históricos y criterios de aceptabilidad para un determinado experimento) (8).

Si el laboratorio no completa un número suficiente de experimentos para establecer una distribución de los testigos negativos estadísticamente sólida (véase el punto 11) durante las investigaciones de competencia (descritas en el punto 9), es admisible que la distribución se establezca durante los primeros exámenes sistemáticos. Este enfoque debe seguir las recomendaciones recogidas en la bibliografía (8) y los resultados de los testigos negativos obtenidos en estos experimentos deben seguir siendo coherentes con los datos publicados de los testigos negativos.

▼M7

Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de su impacto en el mantenimiento de la coherencia entre los datos resultantes y la base de datos históricos de testigos existente del laboratorio. Solo si hubiera incoherencias importantes se justificaría el establecimiento de una nueva base de datos históricos de testigos, en caso de que la evaluación por expertos determine que es diferente de la distribución anterior (véase el punto 11). Durante el nuevo establecimiento, puede que no sea necesaria una base de datos completa sobre testigos negativos para poder realizar una prueba real, siempre que el laboratorio pueda demostrar que sus valores de los testigos negativos en paralelo siguen estando en consonancia con su anterior base de datos o con los correspondientes datos publicados.

Los datos sobre testigos negativos deben consistir en la incidencia de aberraciones cromosómicas estructurales, excluidas las separaciones (*gaps*), en cada animal. Lo ideal sería que los testigos negativos en paralelo estuvieran dentro de los límites de control del 95 % de la distribución de la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio. Cuando haya datos de los testigos negativos en paralelo que queden fuera de los límites de control del 95 %, su inclusión en la distribución de testigos históricos puede ser aceptable en la medida en que dichos datos no sean valores discrepantes extremos y haya pruebas de que el sistema de ensayo está «controlado» (véase el punto 11) y no haya pruebas de fallos técnicos o humanos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparación**

*Selección de la especie animal*

Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Si bien suelen emplearse ratas, también puede ser adecuado el uso de ratones. Puede utilizarse cualquier otra especie apropiada de mamíferos, si se facilita la justificación científica en el informe.

*Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales*

Con roedores, la temperatura en el animalario debe ser de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser idealmente del 50 al 60 %, debe ser como mínimo del 40 % y preferentemente no superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se pueden utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente del producto problema si se administra por esta vía. Los roedores deben alojarse en grupos pequeños (no más de cinco animales por jaula) del mismo sexo y grupo de tratamiento si no se espera conducta agresiva, preferentemente en jaulas de suelo continuo con un enriquecimiento ambiental adecuado. Los animales podrán alojarse por separado solo si está justificado científicamente.

*Preparación de los animales*

Se utilizan normalmente animales adultos jóvenes y sanos (en el caso de los roedores, idealmente de 6-10 semanas de edad al inicio del tratamiento, aunque también pueden aceptarse animales ligeramente más viejos), y se reparten al azar entre los lotes tratados y los testigos. Los animales se identifican individualmente utilizando un método compasivo y mínimamente invasivo (por ejemplo, mediante anillamiento, marcado, implantación de un microchip o identificación biométrica, pero no grapado a las orejas o los dedos), y se deja que se acostumbren a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Debe evitarse la contaminación cruzada por el testigo positivo y el producto problema. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder del ± 20 % del peso medio de cada sexo.

*Preparación de las dosis*

Los productos problema sólidos deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados, o mezclarse con los alimentos o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Los productos problema líquidos pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En lo

▼M7

que respecta a la exposición por inhalación, los productos problema pueden administrarse en forma de gas, de vapor o de aerosol sólido o líquido, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. Deben utilizarse preparaciones recientes del producto problema, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación y definan las condiciones adecuadas de esta.

*Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a las dosis empleadas, y no debe sospecharse que pueda reaccionar químicamente con el producto problema. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Pueden citarse como ejemplos de disolventes o vehículos compatibles comúnmente utilizados el agua, el suero fisiológico, la solución de metilcelulosa, la solución de sal sódica de carboximetilcelulosa, el aceite de oliva y el aceite de maíz. A falta de información histórica o publicada sobre testigos que demuestre que un disolvente o vehículo elegido atípico no induce ninguna aberración estructural ni otro tipo de efectos nocivos, debe realizarse un estudio inicial a fin de establecer la aceptabilidad del testigo de disolvente/vehículo.

**Testigos**

*Testigos positivos*

En principio debe incluirse en cada ensayo un grupo de animales tratados con un producto testigo positivo. Esto puede no aplicarse cuando el laboratorio de ensayo ha demostrado su competencia en la realización del ensayo y ha establecido un intervalo histórico de testigos positivos. Si no se incluye un grupo testigo positivo en paralelo, debe contarse en cada experimento con testigos de examen (portaobjetos fijados y sin teñir). Esto puede conseguirse incluyendo en el examen del estudio muestras de referencias adecuadas que se hayan obtenido y conservado a partir de un experimento con testigo positivo aparte realizado periódicamente (por ejemplo, cada 6 o 18 meses) en el laboratorio donde se realiza el ensayo; por ejemplo, durante las pruebas de competencia y, a continuación, con carácter periódico, en caso necesario.

Los productos utilizados como testigo positivo deben provocar con fiabilidad un aumento detectable en la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas estructurales respecto al nivel espontáneo. Las dosis del testigo positivo deben elegirse de tal forma que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al examinador la identidad de las muestras codificadas. El producto empleado como testigo positivo podrá administrarse por una vía distinta de la del producto problema, con otro programa de tratamiento, y el muestreo podrá efectuarse solo en un único momento. Además, podrá considerarse la utilización como testigo positivo de productos de clases químicas afines, cuando sea posible. En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de productos válidos como testigo positivo.

*Cuadro 1.*

**Ejemplos de productos válidos como testigo positivo**

| Producto | CAS RN |
|---|---|
| Metanosulfonato de etilo | 62-50-0 |
| Metanosulfonato de metilo | 66-27-3 |
| Etil-nitrosourea | 759-73-9 |
| Mitomicina C | 50-07-7 |
| Ciclofosfamida (monohidrato) | 50-18-0 (6055-19-2) |
| Trietilenomelamina | 51-18-3 |

▼M7

*Testigos negativos*

Deben incluirse animales de un grupo testigo negativo en cada tiempo de muestreo y someterse al mismo proceso que los grupos de tratamiento, salvo que no reciben el tratamiento con el producto problema. Si se utiliza un disolvente o vehículo para la administración del producto problema, el grupo testigo recibirá este disolvente o vehículo. No obstante, si mediante los datos históricos de testigos negativos se demuestra que la variabilidad entre animales y la frecuencia de las células con aberraciones estructurales son coherentes en cada momento de muestreo para el laboratorio de ensayo, puede que solo sea necesario un único muestreo del testigo negativo. En los casos en que se realice un único muestreo de los testigos negativos, debe corresponder al primer momento de muestreo utilizado en el estudio.

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

En general, la respuesta de micronúcleos es similar entre animales machos y hembras (9) y se espera que esto sea así también respecto a las aberraciones cromosómicas estructurales; por lo tanto, la mayor parte de los estudios podría realizarse con cualquier sexo. Unos datos que demuestren la existencia de diferencias pertinentes entre machos y hembras (como diferencias de toxicidad sistémica, metabolismo, biodisponibilidad, toxicidad para la médula ósea, etc., con inclusión por ejemplo de un estudio de determinación del intervalo) favorecerían la utilización de ambos sexos. En este caso puede ser conveniente realizar un estudio con ambos sexos, por ejemplo como parte de un estudio de toxicidad por administración continuada. Podría ser adecuado utilizar el diseño factorial en caso de que se utilizaran animales de ambos sexos. En el apéndice 2 se recogen detalles sobre cómo analizar los datos utilizando dicho diseño.

El tamaño de los grupos al principio del estudio debe establecerse de manera que comprendan un mínimo de 5 animales analizables de un mismo sexo, o de cada sexo si se utilizan ambos, por grupo. En caso de que la exposición humana a los productos pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo debe realizarse con animales del sexo correspondiente. Como orientación sobre las necesidades máximas típicas de animales, un estudio de la médula ósea con dos momentos de muestreo con tres grupos tratados y un grupo testigo negativo en paralelo, más un grupo testigo positivo (cada grupo compuesto por cinco animales de un solo sexo), requeriría 45 animales.

**Dosis**

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación del intervalo porque no se dispone aún de datos adecuados para ayudar en la selección de las dosis, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que se vayan a utilizar en el estudio principal (10). El estudio debe tratar de determinar la dosis máxima tolerada (DMT), es decir, la dosis más alta que se tolera sin signos de toxicidad que limite el estudio, en relación con la duración del período de estudio (por ejemplo, reducción del peso corporal o citotoxicidad para el sistema hematopoyético) pero sin llegar a la muerte ni presentar signos de dolor, sufrimiento o angustia que requieran el sacrificio compasivo (11).

La dosis más alta también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad para la médula ósea.

Los productos que presentan saturación de las propiedades toxicocinéticas, o inducen procesos de destoxificación que puedan dar lugar a una disminución de la exposición después de un tratamiento a largo plazo pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso.

A fin de obtener información sobre la relación dosis-respuesta, los estudios completos deben incluir un grupo testigo negativo y un mínimo de tres dosis separadas por un factor que será en general de 2 y nunca superior a 4. Si el producto problema no produce toxicidad en un estudio de determinación del intervalo o según los datos disponibles, la dosis más alta para una administración

▼M7

única debe ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. No obstante, si el producto problema provoca toxicidad, la DMT debe ser la mayor dosis administrada y las dosis deben abarcar preferentemente el intervalo desde la dosis máxima hasta una dosis que provoque toxicidad escasa o nula. Si se observa toxicidad para el tejido diana (médula ósea) a todas las dosis utilizadas en el ensayo, se recomienda hacer otro estudio a dosis no tóxicas. Unos estudios destinados a caracterizar de forma más completa la relación cuantitativa dosis-respuesta pueden necesitar más grupos de dosis. Estos límites pueden variar con determinados tipos de productos problema (por ejemplo, productos farmacéuticos de uso humano) a los que se apliquen requisitos específicos.

**Ensayo límite**

Si los experimentos de determinación del intervalo, o los datos disponibles sobre cepas animales afines, indican que un régimen de tratamiento de, como mínimo, la dosis límite (véase más adelante) no produce efectos tóxicos observables (entre los que se incluirían la depresión de la proliferación de la médula ósea u otros signos de citotoxicidad para el tejido diana) y si, basándose en estudios de genotoxicidad *in vitro* o en datos de productos estructuralmente afines, no cabe esperar genotoxicidad, entonces puede no considerarse necesario realizar un estudio completo con tres dosis, siempre que se haya demostrado que el producto o productos problema alcanzan el tejido diana (médula ósea). En tales casos, podrá ser suficiente una sola dosis, al nivel de la dosis límite. Para un período de administración superior a 14 días, la dosis límite será de 1 000 mg/kg de peso corporal/día. Para un período de administración inferior o igual a 14 días, la dosis límite será de 2 000 mg/kg de peso corporal/día.

**Administración de las dosis**

A la hora de diseñar el ensayo, debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por lo tanto, cuando esté justificado, podrán elegirse vías de exposición como los alimentos, el agua de bebida, la tópica, la subcutánea, la intravenosa, la oral forzada (por sonda), la inhalación, la intratraqueal o la implantación. En cualquier caso, la vía debe elegirse de forma que se garantice una exposición adecuada del tejido o tejidos diana. En general no se recomienda la inyección intraperitoneal, ya que no es una vía de exposición humana prevista, y debe utilizarse solo en casos que tengan justificación científica específica. Si el producto problema se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, en particular en caso de administración única, debe procurarse que el plazo entre el consumo de los alimentos o el agua y el muestreo sea suficiente para permitir la detección de los efectos (véanse los puntos 33-34). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe en principio superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a un máximo de 2 ml/100 g. El uso de volúmenes superiores deberá justificarse. Excepto en el caso de productos problema irritantes o corrosivos, que por lo general producen efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para conseguir la administración de un volumen constante en relación con el peso corporal a todas las dosis.

**Pauta de tratamiento**

Los productos problema se administran normalmente de una vez, pero también puede dividirse la dosis (es decir, realizar dos o más tratamientos el mismo día separados por no más de 2 o 3 horas) con el fin de facilitar la administración de grandes volúmenes. En estas circunstancias, o cuando se administra el producto problema por inhalación, el tiempo de muestreo debe programarse basándose en el momento de la última administración o el final de la exposición.

Se dispone de pocos datos sobre la idoneidad de un protocolo de administración continuada para este ensayo. Sin embargo, en circunstancias en las que sea deseable integrar este ensayo con un ensayo de toxicidad por administración

▼M7

continuada, deberá tenerse cuidado para evitar la pérdida de células mitóticas con lesiones cromosómicas, lo que puede suceder a dosis tóxicas. Esta integración es aceptable siempre y cuando la dosis más alta sea superior o igual a la dosis límite (véase el punto 29) y se le administre a un grupo la dosis límite mientras dure el período de tratamiento. El ensayo de micronúcleos (método B.12) debe considerarse el ensayo *in vivo* de elección para detectar las aberraciones cromosómicas cuando se desee la integración con otros estudios.

Deben tomarse muestras de médula ósea en dos momentos distintos tras el tratamiento único. En el caso de los roedores, el primer intervalo de muestreo debe ser el tiempo equivalente a 1,5 veces la duración del ciclo celular normal (suele ser de 12 a 18 horas después del período de tratamiento). Dado que el tiempo necesario para que el producto o productos problema se absorban y se metabolicen, así como su efecto sobre la cinética del ciclo celular, pueden modificar el momento óptimo para detectar aberraciones cromosómicas, se recomienda tomar otra muestra 24 horas después de la primera. En el primer momento de muestreo, se tratan todos los grupos de dosis y se toman muestras de todos ellos para su análisis; no obstante, en los momentos de muestreo posteriores, solo es necesario administrar la dosis más alta. Si se siguen pautas de tratamiento de más de un día con justificación científica, debe hacerse un solo muestreo en general a un máximo de aproximadamente 1,5 veces la duración del ciclo celular normal desde el último tratamiento.

Tras el tratamiento y antes de la recogida de la muestra, se les inyecta a los animales por vía intraperitoneal una dosis adecuada de un agente que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colcemid o colchicina), y las muestras se toman a un intervalo adecuado a partir de ese momento. En el caso de los ratones, este intervalo hasta el muestreo es aproximadamente de 3-5 horas y en el de las ratas es de 2-5 horas. Se toman las células de la médula ósea, se hinchan, fijan y tiñen, y se analizan en busca de aberraciones cromosómicas (12).

**Observaciones**

Deben hacerse observaciones clínicas generales de los animales de ensayo y registrarse los signos clínicos al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período de mayor intensidad de los efectos previstos tras la administración. Al menos dos veces al día durante el periodo de administración, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Deben pesarse todos los animales al principio del estudio, al menos una vez por semana durante los estudios de administración continuada, y en el momento del sacrificio. En los estudios de al menos una semana de duración, el consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. Si el producto problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie el agua y al menos una vez por semana. Los animales que presenten signos de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse de forma compasiva antes de que termine el período del ensayo (11).

**Exposición del tejido diana**

Debe tomarse una muestra de sangre en el momento o momentos adecuados para permitir la investigación de los niveles plasmáticos de los productos problema, a fin de demostrar que ha habido exposición de la médula ósea, cuando esté justificado y cuando no se disponga de otros datos de exposición (véase el punto 44).

**Preparación de la médula ósea y de los cromosomas**

Inmediatamente después del sacrificio compasivo, se extraen células de la médula ósea del fémur o la tibia de los animales, se exponen a una solución hipotónica y se fijan. A continuación, las células en metafase se extienden en portaobjetos y se tiñen según métodos establecidos ((3) (12)).

▼M7

**Análisis**

Todos los portaobjetos, incluidos los de los testigos positivos y negativos, deben codificarse independientemente antes del análisis y deben aleatorizarse de forma que el examinador no tenga conocimiento de cómo se han tratado.

Se evalúa la citotoxicidad determinando el índice mitótico en un mínimo de 1 000 células por animal, en todos los animales tratados (incluidos los testigos positivos) y en los animales usados como testigos negativos sin tratar o solo con disolvente/vehículo.

Deben analizarse al menos 200 metafases en cada animal para detectar aberraciones cromosómicas estructurales, contando tanto con las separaciones (*gaps*) como sin ellas. No obstante, en caso de que la base de datos históricos de testigos negativos indique que la frecuencia media de aberraciones cromosómicas estructurales de fondo es < 1 % en el laboratorio de ensayo, debe considerarse el examen de células adicionales. Las aberraciones de tipo cromosoma y las de tipo cromátida deben registrarse por separado y clasificarse en subtipos (roturas, intercambios). Los procedimientos seguidos en el laboratorio deben garantizar que el análisis de las aberraciones cromosómicas es realizado por examinadores bien formados y es objeto de una revisión por pares, si procede. Reconociendo que los métodos de preparación de los portaobjetos provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la consiguiente pérdida de cromosomas, las células examinadas deben, por tanto, contener un número de centrómeros no inferior a $2n \pm 2$, donde $n$ es el número de cromosomas haploides de la especie.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de cuadro. Deben evaluarse respecto a cada animal el índice mitótico, el número de células en metafase examinadas, el número de aberraciones por célula en metafase y el porcentaje de células con aberraciones cromosómicas estructurales. Se debe hacer una relación de los distintos tipos de dichas aberraciones, con su número y frecuencia, respecto a los grupos tratados y los testigos. Las separaciones, así como las células poliploides y las células con cromosomas endorreduplicados, se registran por separado. La frecuencia de las separaciones se recoge en el informe, pero por lo general no se incluye en el análisis de la frecuencia total de aberraciones estructurales. Si no se observan diferencias en la respuesta de un sexo y otro, los datos pueden combinarse para el análisis estadístico. Deben también consignarse los datos sobre toxicidad y signos clínicos de los animales.

**Criterios de aceptabilidad**

Los siguientes criterios determinan la aceptabilidad del ensayo:

a) Los datos del testigo negativo en paralelo se consideran aceptables para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio (véanse los puntos 11-14).

b) Los testigos positivos en paralelo o los testigos de examen deben inducir respuestas compatibles con las obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo (véanse los puntos 20-21).

c) Se ha analizado el número adecuado de dosis y células.

d) Los criterios de selección de la concentración más alta son coherentes con los descritos en los puntos 25-28.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si:

▼M7

a) al menos uno de los grupos de tratamiento presenta un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas estructurales (excluidas las separaciones) en comparación con el testigo negativo en paralelo,

b) este aumento está relacionado con la dosis al menos en uno de los momentos de muestreo cuando se evalúan con una prueba de tendencia adecuada, y

c) alguno de estos resultados está fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson).

Si se examina únicamente la dosis más alta en un momento particular de muestreo, el producto problema se considera claramente positivo si se ve un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo y los resultados están fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson). En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (13). Al realizar un análisis de la relación dosis-respuesta, deben someterse al mismo por lo menos tres grupos tratados con el producto problema. Las pruebas estadísticas deben utilizar como unidad experimental el animal. Un resultado positivo en el ensayo de aberraciones cromosómicas indica que el producto problema provoca aberraciones cromosómicas estructurales en la médula ósea de la especie estudiada.

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas:

a) ninguno de los grupos de tratamiento presenta un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de células con aberraciones cromosómicas estructurales (excluidas las separaciones) en comparación con el testigo negativo simultáneo,

b) no hay ningún aumento relacionado con la concentración en ningún momento de muestreo cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

c) todos los resultados están dentro de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson), y

d) ha habido exposición de la médula ósea al producto problema.

En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (13). Como pruebas de exposición de la médula ósea a un producto problema pueden citarse la reducción del índice mitótico o la medición de los niveles hemáticos o plasmáticos del producto o productos problema. En caso de administración por vía intravenosa, no hacen falta pruebas de la exposición. Alternativamente, para demostrar la exposición de la médula ósea es posible utilizar los datos de ADME obtenidos en un estudio independiente utilizando la misma vía y la misma especie. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, el producto problema no provoca aberraciones cromosómicas estructurales en la médula ósea de la especie estudiada.

No se requiere ninguna verificación de una respuesta positiva clara o negativa clara.

En los casos en que la respuesta no sea claramente negativa ni positiva y con el fin de ayudar a determinar la importancia biológica de un resultado (por ejemplo, un incremento límite o débil), los datos deben ser evaluados por expertos o hay que completar otras investigaciones de los experimentos existentes. En algunos casos, puede ser de utilidad el análisis de más células o la repetición de un experimento en condiciones experimentales modificadas.

▼M7

En casos excepcionales, incluso después de otras investigaciones, los datos no permiten concluir si el producto problema produce resultados positivos o negativos, y el estudio deberá considerarse, por tanto, como de resultado dudoso.

Deben consignarse por separado las frecuencias de las metafases poliploides y endorreduplicadas entre las metafases totales. El aumento del número de células poliploides o endorreduplicadas puede indicar que el producto problema es capaz de inhibir procesos mitóticos o la progresión del ciclo celular (véase el punto 3).

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Resumen*

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

— estabilidad del producto problema, si se conoce.

*Sustancia con un solo componente:*

— aspecto físico, hidrosolubilidad, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.

*Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas:*

— en la medida de lo posible, caracterizadas por la identidad química (véase más arriba), presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes.

*Preparación del producto problema:*

— justificación de la elección del vehículo;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen;

— preparación de formulaciones para la administración con los alimentos, con el agua de bebida o por inhalación;

— determinaciones analíticas de las formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, concentraciones nominales), si se han llevado a cabo;

*Animales de ensayo:*

— especie y cepa utilizadas y justificación de su utilización;

— número, edad y sexo de los animales;

— origen, condiciones del alojamiento, alimentación, etc.;

— método para la identificación individual de los animales;

— para los estudios a corto plazo: peso individual de los animales al inicio y al final del ensayo; para los estudios de más de una semana: pesos corporales individuales durante el estudio y consumo de alimentos; deben incluirse el intervalo, la media y la desviación típica de los pesos corporales de cada grupo.

▼**M7**

*Condiciones del ensayo:*

— testigos positivos y negativos (vehículo o disolvente);

— datos del estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo;

— justificación de la selección de las dosis;

— datos de la formulación del producto problema;

— datos sobre la administración del producto problema;

— fundamento de la elección de la vía de administración y de la duración de esta;

— métodos para verificar que el producto o productos problema han llegado a la circulación general o a la médula ósea;

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) calculadas a partir del consumo y de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida, en su caso;

— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua;

— método de sacrificio compasivo;

— método de analgesia (en su caso);

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y muestreo y justificación de las decisiones;

— métodos de preparación de los portaobjetos;

— métodos de determinación de la toxicidad;

— identidad del producto que detiene la división celular en la metafase, su concentración, dosis y tiempo de administración antes del muestreo;

— procedimientos de aislamiento y conservación de las muestras;

— criterios de examen de las aberraciones;

— número de células en metafase analizadas por animal y número de células analizadas para la determinación del índice mitótico;

— criterios de aceptabilidad del estudio;

— criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o no concluyentes.

*Resultados:*

— estado de los animales antes y a lo largo del ensayo, incluidos los signos de toxicidad;

— índice mitótico de cada animal por separado;

— tipo y número de aberraciones y de células aberrantes en cada animal por separado;

— número total de aberraciones por grupo, con medias y desviaciones típicas;

— número de células con aberraciones por grupo, con medias y desviaciones típicas;

— variaciones de la ploidía, en su caso, incluidas las frecuencias de las células poliploides o endorreduplicadas;

▼M7

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible;

— análisis estadísticos y métodos aplicados;

— datos justificativos de que se ha producido la exposición de la médula ósea;

— datos de los testigos negativos y positivos estudiados en paralelo, con intervalos, medias y desviaciones típicas;

— datos históricos de los testigos negativos y positivos, con intervalos, medias y desviaciones típicas y límites de control del 95 % para la distribución, así como el período de tiempo comprendido y el número de observaciones;

— criterios cumplidos para determinar una respuesta positiva o negativa.

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

*Referencias*

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Adler, I.D. (1984), «Cytogenetic Tests in Mammals», in Mutagenicity Testing: A Practical Approach, Venittand, S., J.M. Parry (eds.), IRL Press, Washington, DC, pp. 275-306.

(3) Preston, R.J. *et al*. (1987), Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells, Mutation Research, Vol. 189/2, pp. 157-165.

(4) Richold, M. *et al*. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays», in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(5) Tice, R.R. *et al*. (1994), Report from the working group on the *in vivo* mammalian bone marrow chromosomal aberration test, Mutation Research, Vol. 312/3, pp. 305-312.

(6) Adler, I.D. *et al*. (1998), Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 417/1, pp. 19-30.

(7) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(8) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(9) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(10) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(11) OCDE (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, N°19, OECD Publishing, Paris.

(12) Pacchierotti, F., V. Stocchi (2013), Analysis of chromosome aberrations in somatic and germ cells of the mouse, Methods in Molecular Biology, Vol. 1044, pp. 147-163.

(13) Lovell, D.P. *et al*. (1989), «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

▼**M7**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Aneuploidía**: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas en uno o varios cromosomas, pero sin multiplicar dotaciones completas de cromosomas (véase «poliploidía»).

**Centrómero**: Región o regiones del cromosoma con las que se asocian las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Aberración de tipo cromátida**: Lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de cromátidas solas o en la rotura y reunión entre cromátidas.

**Aberración de tipo cromosoma**: Lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura, o en la rotura y reunión, de ambas cromátidas en el mismo sitio.

**Endorreduplicación**: Proceso en el que, tras una fase S de replicación del ADN, el núcleo no pasa a la mitosis sino que inicia otra fase S. El resultado son cromosomas con 4, 8, 16, etc. cromátidas.

**Separación (*gap*)**: Lesión acromática más estrecha que la anchura de una cromátida, y con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

**Índice mitótico**: Relación entre el número de células en mitosis y el número total de células de una población, que es una medida de la proliferación de dicha población celular.

**Aberración numérica**: Cambio del número de cromosomas respecto al número normal característico de los animales empleados (aneuploidía).

**Poliploidía**: Aberración cromosómica numérica que implica un cambio en el número de toda la dotación cromosómica, en contraste con un cambio numérico en una parte de la dotación cromosómica (aneuploidía).

**Aberración cromosómica estructural**: Cambio de la estructura cromosómica detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular, observado como deleciones y fragmentaciones, intracambios o intercambios.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M7

*Apéndice 2*

## DISEÑO FACTORIAL PARA IDENTIFICAR LAS DIFERENCIAS DE SEXO EN EL ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS *IN VIVO*

### Diseño factorial y su análisis

En este diseño, un mínimo de 5 machos y 5 hembras se someten a ensayo a cada concentración, lo que resulta en la utilización de un mínimo de 40 animales (20 machos y 20 hembras, más los testigos positivos pertinentes).

Este diseño, que es uno de los diseños factoriales más simples, es equivalente a un análisis de varianza de dos factores, con el sexo y el nivel de concentración como efectos principales. Los datos pueden analizarse con numerosos paquetes de software estadístico estándar tales como SPSS, SAS, STATA, Genstat, así como utilizando R.

El análisis divide la variabilidad de la serie de datos en la variabilidad entre sexos, la variabilidad entre las concentraciones y la relativa a la interacción entre los sexos y las concentraciones. Cada uno de los términos se somete a prueba frente a una estimación de la variabilidad entre los animales replicados dentro de los grupos de animales del mismo sexo que han recibido la misma concentración. Todos los detalles de la metodología subyacente se encuentran en muchos manuales estadísticos conocidos (véanse las referencias) y en las funciones de «ayuda» de los paquetes estadísticos.

El análisis se lleva a cabo inspeccionando el término de la interacción sexo x concentración en el cuadro de ANOVA ([1]). A falta de un término de interacción significativo, los valores combinados de distintos sexos o niveles de concentración ofrecen pruebas estadísticas válidas entre los niveles, sobre la base del término de ANOVA de variabilidad intragrupo puesta en común.

El análisis continúa dividiendo la estimación de la variabilidad entre concentraciones en contrastes que permiten una prueba de contrastes lineales y cuadráticos de las respuestas a través de los niveles de concentración. Cuando existe un término de interacción significativa sexo x concentración, este término también puede dividirse en contrastes de interacción lineal x sexo y cuadrático x sexo. Estos términos permiten pruebas de si las respuestas a la concentración son paralelas en los dos sexos, o si existe una diferencia en la respuesta entre estos.

La estimación de la variabilidad intragrupo puesta en común se puede utilizar para proporcionar pruebas pareadas de la diferencia entre medias. Estas comparaciones podrían realizarse entre las medias para los dos sexos y entre las medias para los diferentes niveles de concentración, así como para las comparaciones con los niveles de los testigos negativos. En los casos en los que existe una interacción significativa pueden hacerse comparaciones entre las medias de concentraciones diferentes dentro de un sexo o entre las medias de los sexos a la misma concentración.

### Bibliografía

Hay muchos manuales estadísticos que debaten la teoría, el diseño, la metodología, el análisis y la interpretación de los diseños factoriales que van desde los análisis bifactoriales más sencillos hasta las formas más complejas utilizadas en la metodología de diseño de experimentos. La lista que sigue no es exhaustiva. Algunos libros proporcionan ejemplos resueltos de diseños comparables, en algunos casos con el código para aplicar los análisis utilizando diversos paquetes de software.

([1]) Los estadísticos que siguen un enfoque de modelización como el de usar modelos lineales generales pueden plantear el análisis de forma diferente, pero comparable, sin derivar necesariamente el cuadro tradicional de ANOVA, que se basa en enfoques algorítmicos para calcular las estadísticas elaboradas en una edad pre-informática.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

## B.12. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE MAMÍFERO

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE 474 (2016). Forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. Se ha elaborado un documento de la OCDE que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a dichas directrices de ensayo (1).

El ensayo de micronúcleos de mamífero *in vivo* es especialmente relevante para evaluar la genotoxicidad porque, aunque pueden variar según la especie, los factores de los procesos del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de la reparación del ADN están activos y contribuyen a las respuestas. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para ahondar en el estudio de la genotoxicidad detectada en un sistema *in vitro*.

El ensayo de micronúcleos de mamífero *in vivo* se emplea para detectar lesiones provocadas por el producto problema en los cromosomas o el aparato mitótico de los eritroblastos. El ensayo sirve para evaluar la formación de micronúcleos en los eritrocitos tomados bien de la médula ósea o bien de la sangre periférica de los animales (por lo general, roedores).

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

Cuando los eritroblastos de la médula ósea se transforman en eritrocitos inmaduros (a veces denominados también reticulocitos o eritrocitos policromáticos), el núcleo principal es eliminado, pero los micronúcleos que se hayan formado pueden permanecer en el citoplasma. Resulta más fácil visualizar o detectar los micronúcleos en estas células, pues carecen de núcleo principal. El aumento de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos inmaduros de animales tratados es indicativo de la inducción de aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

Los eritrocitos micronucleados recién formados se identifican y se cuantifican bien mediante tinción seguida de examen visual con microscópico, o bien mediante análisis automatizado. El recuento de suficientes eritrocitos inmaduros en la médula ósea o la sangre periférica de animales adultos se facilita en gran medida mediante la utilización de un programa automatizado de examen. Estos programas son alternativas aceptables a la evaluación manual (2). En estudios comparativos se ha puesto de manifiesto que tales métodos, utilizando los pertinentes patrones de calibración, pueden proporcionar una mayor sensibilidad y reproducibilidad intralaboratorios e interlaboratorios que el examen microscópico manual (3) (4). Entre los sistemas automatizados que permiten medir la frecuencia de eritrocitos micronucleados se incluyen, por ejemplo, los citómetros de flujo (5), los programas de análisis de imágenes (6) (7), y los citómetros de barrido por láser (8).

Aunque no forme parte normalmente del ensayo, es posible distinguir los fragmentos de cromosomas de los cromosomas enteros aplicando diversos criterios. Entre estos se encuentra la presencia o la ausencia de cinetocoro o de ADN centromérico, que son tanto el uno como el otro característicos de los cromosomas intactos. La ausencia de cinetocoro o de ADN centromérico indica que el micronúcleo solo contiene fragmentos de cromosomas, mientras que su presencia es indicativa de la pérdida de cromosomas.

En el apéndice 1 se dan las definiciones de la terminología utilizada.

▼M7

CONSIDERACIONES INICIALES

La médula ósea de roedores adultos jóvenes es el tejido diana de las lesiones genéticas en este ensayo, ya que los eritrocitos se producen en este tejido. La medición de los micronúcleos en eritrocitos inmaduros en la sangre periférica es aceptable en otras especies de mamíferos respecto a las cuales se haya demostrado que poseen la sensibilidad adecuada para detectar productos que provocan aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales (por inducción de la formación de micronúcleos en eritrocitos inmaduros) y se aporte una justificación científica. La frecuencia de la presencia de eritrocitos inmaduros micronucleados es el principal parámetro. La frecuencia de la presencia de eritrocitos maduros que contienen micronúcleos en la sangre periférica también puede utilizarse como parámetro en especies sin una fuerte selección esplénica contra las células micronucleadas y si los animales han sido tratados de forma continua durante un período superior a la vida de los eritrocitos en la especie utilizada (por ejemplo, 4 semanas o más en el caso del ratón).

Si hay pruebas de que el producto o productos problema, o sus metabolitos, no llegan al tejido diana, puede no proceder la realización del presente ensayo.

Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines reglamentarios, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la reglamentación impone el ensayo de la mezcla.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se exponen los animales al producto problema por una vía adecuada. Si se utiliza la médula ósea, los animales se sacrifican de forma compasiva, en uno o varios momentos adecuados tras el tratamiento, se extrae la médula ósea, se hacen los frotis y se tiñen (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). Si se emplea sangre periférica, esta se extrae en uno o varios momentos adecuados tras el tratamiento, se hacen los frotis y se tiñen (12) (16) (17) (18). Cuando el tratamiento se administra de forma aguda, es importante seleccionar los momentos en que se toman las muestras de médula ósea o de sangre para que en ellos se pueda detectar la inducción de la formación de eritrocitos inmaduros micronucleados relacionada con el tratamiento. En el caso de la toma de sangre periférica, también deberá haber transcurrido tiempo suficiente para que estos eritrocitos aparezcan en la sangre circulante. Se analizan los frotis para detectar la presencia de micronúcleos, por visualización utilizando un microscopio, análisis de imágenes, citometría de flujo, o citometría de barrido por láser.

VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO

**Investigaciones de competencia**

A fin de establecer que posee la suficiente experiencia con la realización del ensayo antes de utilizarlo para hacer ensayos sistemáticos, el laboratorio debe haber demostrado su capacidad de reproducir los resultados previstos a partir de los datos publicados (17) (19) (20) (21) (22) en cuanto a frecuencias de los micronúcleos con un mínimo de dos productos como testigo positivo (incluidas las respuestas débiles inducidas por dosis bajas de los testigos positivos), como las que figuran en el cuadro 1, y con testigos de disolvente/vehículo compatibles (véase el punto 26). Estos experimentos deben utilizar dosis que den aumentos relacionados con la dosis y reproducibles, y demostrar la sensibilidad y el intervalo dinámico del sistema de ensayo en el tejido de interés (médula ósea o sangre periférica), empleando el método de examen utilizado en el laboratorio. Este requisito no es aplicable a los laboratorios que tienen experiencia, esto es, que disponen de una base de datos históricos, según se define en los puntos 14-18.

**Datos sobre testigos históricos**

En el transcurso de las investigaciones de competencia, el laboratorio debe demostrar:

— un intervalo y una distribución de los testigos positivos históricos, y

▼M7

— un intervalo y una distribución de los testigos negativos históricos.

Cuando se obtengan datos por primera vez en relación con la distribución de testigos negativos históricos, los testigos negativos en paralelo deben ser coherentes con los datos publicados de los testigos, si existen. Según se añadan más datos experimentales sobre la distribución de los testigos históricos, los testigos negativos en paralelo deben situarse idealmente dentro de los límites de control del 95 % de dicha distribución. La base de datos históricos del laboratorio de testigos negativos debe ser estadísticamente sólida para garantizar la capacidad del laboratorio de evaluar la distribución de sus datos sobre los testigos negativos. La bibliografía sugiere que puede ser necesario un mínimo de 10 experimentos, pero que sería preferible contar con al menos 20 experimentos realizados en condiciones experimentales comparables. Los laboratorios deben utilizar métodos de control de calidad, como gráficos de control (por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (23)), con el fin de determinar la variabilidad de sus datos y de demostrar que la metodología está «controlada» en su laboratorio. En la bibliografía pueden encontrarse más recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (es decir, criterios de inclusión y exclusión de datos en los datos históricos y criterios de aceptabilidad para un determinado experimento) (24).

Si el laboratorio no completa un número suficiente de experimentos para establecer una distribución de los testigos negativos estadísticamente sólida (véase el punto 15) durante las investigaciones de competencia (descritas en el punto 13), es admisible que la distribución se establezca durante los primeros exámenes sistemáticos. Este enfoque debe seguir las recomendaciones recogidas en la bibliografía (24) y los resultados de los testigos negativos obtenidos en estos experimentos deben seguir siendo coherentes con los datos publicados de los testigos negativos.

Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de su impacto en el mantenimiento de la coherencia entre los datos resultantes y la base de datos históricos de testigos existente del laboratorio. Solo si hubiera incoherencias importantes se justificaría el establecimiento de una nueva base de datos históricos de testigos, en caso de que la evaluación por expertos determine que es diferente de la distribución anterior (véase el punto 15). Durante el nuevo establecimiento, puede que no sea necesaria una base de datos completa sobre testigos negativos para poder realizar una prueba real, siempre que el laboratorio pueda demostrar que sus valores de los testigos negativos en paralelo siguen estando en consonancia con su anterior base de datos o con los correspondientes datos publicados.

Los datos sobre testigos negativos deben consistir en la incidencia de eritrocitos inmaduros con micronúcleos en cada animal. Lo ideal sería que los testigos negativos en paralelo estuvieran dentro de los límites de control del 95 % de la distribución de la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio. Cuando haya datos de los testigos negativos en paralelo que queden fuera de los límites de control del 95 %, su inclusión en la distribución de testigos históricos puede ser aceptable en la medida en que dichos datos no sean valores discrepantes extremos y haya pruebas de que el sistema de ensayo está «controlado» (véase el punto 15) y no haya pruebas de fallos técnicos o humanos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparación**

*Selección de la especie animal*

Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Pueden utilizarse ratones, ratas, u otras especies adecuadas de mamíferos. Si se emplea sangre periférica, se debe comprobar que la eliminación esplénica de células con micronúcleos de la circulación no compromete la detección de la formación de micronúcleos inducida en la especie seleccionada. Esto se ha comprobado claramente en el caso de la sangre periférica de ratón y

▼M7

rata (2). La justificación científica para la utilización de especies distintas de las ratas y los ratones debe facilitarse en el informe. Si se utilizan especies que no sean de roedores, se recomienda que la medición de los micronúcleos inducidos se integre en otro ensayo adecuado de toxicidad.

*Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales*

Con roedores, la temperatura en el animalario debe ser de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser idealmente del 50 al 60 %, debe ser como mínimo del 40 % y preferentemente no superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se pueden utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente del producto problema si se administra por esta vía. Los roedores deben alojarse en grupos pequeños (no más de cinco animales por jaula) del mismo sexo y grupo de tratamiento si no se espera conducta agresiva, preferentemente en jaulas de suelo continuo con un enriquecimiento ambiental adecuado. Los animales podrán alojarse por separado solo si está justificado científicamente.

*Preparación de los animales*

Se utilizan normalmente animales adultos jóvenes y sanos (en el caso de los roedores, idealmente de 6-10 semanas de edad al inicio del tratamiento, aunque también pueden aceptarse animales ligeramente más viejos), y se reparten al azar entre los lotes tratados y los testigos. Los animales se identifican individualmente utilizando un método compasivo y mínimamente invasivo (por ejemplo, mediante anillamiento, marcado, implantación de un microchip o identificación biométrica, pero no grapado a las orejas o los dedos), y se deja que se acostumbren a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Debe evitarse la contaminación cruzada por el testigo positivo y el producto problema. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder del ± 20 % del peso medio de cada sexo.

*Preparación de las dosis*

Los productos problema sólidos deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados, o mezclarse con los alimentos o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Los productos problema líquidos pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En lo que respecta a la exposición por inhalación, los productos problema pueden administrarse en forma de gas, de vapor o de aerosol sólido o líquido, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. Deben utilizarse preparaciones recientes del producto problema, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación y definan las condiciones adecuadas de esta.

**Condiciones del ensayo**

*Disolvente o vehículo*

El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a las dosis empleadas, y no debe tener la posibilidad de reaccionar químicamente con los productos problema. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Pueden citarse como ejemplos de disolventes o vehículos compatibles comúnmente utilizados el agua, el suero fisiológico, la solución de metilcelulosa, la solución de sal sódica de carboximetilcelulosa, el aceite de oliva y el aceite de maíz. A falta de información histórica o publicada sobre testigos que demuestre que un disolvente o vehículo elegido atípico no induce la formación de micronúcleos ni ningún otro tipo de efectos nocivos, debe realizarse un estudio inicial a fin de establecer la aceptabilidad del testigo de disolvente o vehículo.

▼M7

**Testigos**

*Testigos positivos*

En principio debe incluirse en cada ensayo un grupo de animales tratados con un producto testigo positivo. Esto puede no aplicarse cuando el laboratorio de ensayo ha demostrado su competencia en la realización del ensayo y ha establecido un intervalo histórico de testigos positivos. Si no se incluye un grupo testigo positivo en paralelo, debe contarse en cada experimento con testigos de examen (portaobjetos fijados y sin teñir o muestras de suspensiones celulares, según el método de examen). Esto puede conseguirse incluyendo en el examen del estudio muestras de referencias adecuadas que se hayan obtenido y conservado a partir de un experimento con testigo positivo aparte realizado periódicamente (por ejemplo, cada 6 o 18 meses); por ejemplo, durante las pruebas de competencia y, a continuación, con carácter periódico, en caso necesario.

Los productos utilizados como testigo positivo deben provocar con fiabilidad un aumento detectable en la frecuencia de los micronúcleos respecto al nivel espontáneo. Cuando se emplee un examen manual por microscopia, las dosis del testigo positivo deben elegirse de tal forma que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al examinador la identidad de las muestras codificadas. El producto empleado como testigo positivo podrá administrarse por una vía distinta de la del producto problema, con otro programa de tratamiento, y el muestreo podrá efectuarse solo en un único momento. Además, podrá considerarse la utilización como testigo positivo de productos de clases químicas afines, cuando sea posible. En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de productos válidos como testigo positivo.

*Cuadro 1.*

**Ejemplos de productos válidos como testigo positivo**

| Productos y CASRN |
|---|
| Metanosulfonato de etilo [CASRN 62-50-0] |
| Metanosulfonato de metilo [CASRN 66-27-3] |
| Etil-nitrosourea [CASRN 759-73-9] |
| Mitomicina C [CASRN 50-07-7] |
| Ciclofosfamida (monohidrato) [CASRN 50-18-0 (CASRN 6055-19-2)] |
| Trietilenomelamina [CASRN 51-18-3] |
| Colchicina [CASRN 64-86-8] o vimblastina [CASRN 865-21-4] — como aneúgenos |

*Testigos negativos*

Deben incluirse animales de un grupo testigo negativo en cada tiempo de muestreo y someterse al mismo proceso que los grupos de tratamiento, salvo que no reciben el tratamiento con el producto problema. Si se utiliza un disolvente o vehículo para la administración del producto problema, el grupo testigo recibirá este disolvente o vehículo. No obstante, si mediante los datos históricos de testigos negativos se demuestra que la variabilidad entre animales y la frecuencia de las células con micronúcleos son coherentes en cada momento de muestreo en el laboratorio de ensayo, puede que solo sea necesario un único muestreo del testigo negativo. En los casos en que se realice un único muestreo de los testigos negativos, debe corresponder al primer momento de muestreo utilizado en el estudio.

▼M7

Si se emplea sangre periférica, puede aceptarse una muestra previa al tratamiento en lugar de un testigo negativo en paralelo en los estudios a corto plazo si los resultados son coherentes con la base de datos históricos de testigos del laboratorio de ensayo. Se ha demostrado que en las ratas la toma de pequeñas muestras previas al tratamiento (por ejemplo, de menos de 100 µl/día) tiene un impacto mínimo sobre la frecuencia espontánea de micronúcleos (25).

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

En general, la respuesta de micronúcleos es similar entre machos y hembras y, por lo tanto, la mayor parte de los estudios podría realizarse con cualquier sexo (26). Unos datos que demostraran la existencia de diferencias pertinentes entre machos y hembras (como diferencias de toxicidad sistémica, metabolismo, biodisponibilidad, toxicidad para la médula ósea, etc., por ejemplo en un estudio de determinación del intervalo) favorecerían la utilización de ambos sexos. En este caso puede ser conveniente realizar un estudio con ambos sexos, por ejemplo como parte de un estudio de toxicidad por administración continuada. Podría ser adecuado utilizar el diseño factorial en caso de que se utilizaran animales de ambos sexos. En el apéndice 2 se recogen detalles sobre cómo analizar los datos utilizando dicho diseño.

El tamaño de los grupos al principio del estudio debe establecerse de manera que comprendan un mínimo de 5 animales analizables de un mismo sexo, o de cada sexo si se utilizan ambos, por grupo. En caso de que la exposición humana a los productos pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo debe realizarse con animales del sexo correspondiente. Como orientación sobre las necesidades máximas típicas de animales, un estudio de la médula ósea realizado de acuerdo con los parámetros establecidos en el punto 37 con tres grupos tratados y testigos negativo y positivo en paralelo (cada grupo compuesto por cinco animales de un solo sexo), requeriría entre 25 y 35 animales.

**Dosis**

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación del intervalo porque no se dispone aún de datos adecuados para ayudar en la selección de las dosis, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que se vayan a utilizar en el estudio principal (27). El estudio debe tratar de determinar la dosis máxima tolerada (DMT), es decir, la dosis más alta que se tolera sin signos de toxicidad que limite el estudio, en relación con la duración del período de estudio (por ejemplo, reducción del peso corporal o citotoxicidad para el sistema hematopoyético pero sin llegar a la muerte ni presentar signos de dolor, sufrimiento o angustia que requieran el sacrificio compasivo (28)).

La dosis más alta también puede definirse como la dosis que produce toxicidad en la médula ósea (por ejemplo, una reducción de la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos en la médula ósea o en la sangre periférica superior al 50 %, pero hasta no menos del 20 % del valor del testigo). No obstante, al analizar las células positivas para el CD71 en la circulación sanguínea periférica (es decir, mediante citometría de flujo), esta fracción muy joven de eritrocitos inmaduros responde a los estímulos tóxicos más rápidamente que la cohorte positiva para el ARN de eritrocitos inmaduros, que es más grande. Por lo tanto, puede ponerse de manifiesto una mayor toxicidad aparente con diseños de exposición aguda que examinen la fracción de eritrocitos inmaduros positivos para el CD71 respecto a los que identifican eritrocitos inmaduros sobre la base del contenido de ARN. Por esta razón, cuando en los experimentos se utilizan cinco o menos días de tratamiento, la dosis más alta de los productos problema que causa toxicidad puede definirse como la dosis que produce una reducción estadísticamente significativa de la fracción de eritrocitos inmaduros positivos para el CD71 respecto al total de eritrocitos, pero hasta no menos del 5 % del valor del testigo (29).

▼M7

Los productos que presentan saturación de las propiedades toxicocinéticas, o inducen procesos de destoxificación que puedan dar lugar a una disminución de la exposición después de una administración a largo plazo pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso.

A fin de obtener información sobre la relación dosis-respuesta, los estudios completos deben incluir un grupo testigo negativo y un mínimo de tres dosis separadas por un factor que será en general de 2 y nunca superior a 4. Si el producto problema no produce toxicidad en el estudio de determinación del intervalo o según los datos existentes, la dosis más alta con un período de administración de 14 días o más debe ser de 1 000 mg/kg de peso corporal/día o, en caso de administración durante un período inferior a 14 días, de 2 000 mg/kg de peso corporal/día. No obstante, si el producto problema provoca toxicidad, la DMT debe ser la mayor dosis administrada y las dosis deben abarcar preferentemente el intervalo desde la dosis máxima hasta una dosis que provoque toxicidad escasa o nula. Si se observa toxicidad para el tejido diana (médula ósea) a todas las dosis utilizadas en el ensayo, se recomienda hacer otro estudio a dosis no tóxicas. Unos estudios destinados a caracterizar de forma más completa la relación cuantitativa dosis-respuesta pueden necesitar más grupos de dosis. Estos límites pueden variar con determinados tipos de productos problema (por ejemplo, productos farmacéuticos de uso humano) a los que se apliquen requisitos específicos.

**Ensayo límite**

Si los experimentos de determinación del intervalo, o los datos disponibles sobre cepas animales afines, indican que un régimen de tratamiento de, como mínimo, la dosis límite (véase más adelante) no produce efectos tóxicos observables (entre los que se incluirían la depresión de la proliferación de la médula ósea u otros signos de citotoxicidad para el tejido diana) y si, basándose en estudios de genotoxicidad *in vitro* o en datos de productos estructuralmente afines, no cabe esperar genotoxicidad, entonces puede no considerarse necesario realizar un estudio completo con tres dosis, siempre que se haya demostrado que el producto o productos problema alcanzan el tejido diana (médula ósea). En tales casos, podrá ser suficiente una sola dosis, al nivel de la dosis límite. Cuando la administración tiene lugar durante un período de 14 días o más, la dosis límite será de 1 000 mg/kg de peso corporal/día. Si el período de administración es inferior a 14 días, la dosis límite será de 2 000 mg/kg de peso corporal/día.

**Administración de las dosis**

A la hora de diseñar el ensayo, debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por lo tanto, en casos justificados podrán elegirse vías de exposición como los alimentos, el agua de bebida, la tópica, la subcutánea, la intravenosa, la oral forzada (por sonda), la inhalación, la intratraqueal o la implantación. En cualquier caso, la vía debe elegirse de forma que se garantice una exposición adecuada del tejido o tejidos diana. En general no se recomienda la inyección intraperitoneal, ya que no es una vía de exposición humana prevista, y debe utilizarse solo en casos que tengan justificación científica específica. Si el producto problema se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, en particular en caso de administración única, debe procurarse que el plazo entre el consumo de los alimentos o el agua y el muestreo sea suficiente para permitir la detección de los efectos (véase el punto 37). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe en principio superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a un máximo de 2 ml/100 g. El uso de volúmenes superiores deberá justificarse. Excepto en el caso de productos problema irritantes o corrosivos, que por lo general producen efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para conseguir la administración de un volumen constante en relación con el peso corporal a todas las dosis.

▼M7

**Pauta de tratamiento**

De preferencia, se efectúan 2 o más tratamientos a intervalos de 24 horas, especialmente cuando se integra este ensayo en otros estudios de toxicidad. También es posible administrar tratamientos únicos cuando esté científicamente justificado (por ejemplo, productos problema conocidos por bloquear el ciclo celular). Los productos problema también pueden administrarse en dosis divididas (es decir, en dos o más tratamientos el mismo día separados por no más de 2 o 3 horas) con el fin de facilitar la administración de grandes volúmenes. En estas circunstancias, o cuando se administra el producto problema por inhalación, el tiempo de muestreo debe programarse basándose en el momento de la última administración o el final de la exposición.

El ensayo puede realizarse con ratas o ratones de tres maneras:

a. Se administra a los animales, en una sola vez, el producto problema. Las muestras de médula ósea se toman al menos en dos ocasiones (de grupos independientes de animales), no antes de 24 horas tras el tratamiento y sin sobrepasar las 48 horas desde el tratamiento, con intervalos adecuados entre las tomas de muestra, a menos que se sepa que el producto problema tiene una semivida excepcionalmente larga. Si se extraen muestras antes de que transcurran 24 horas desde el tratamiento, deberá justificarse. Las muestras de sangre periférica han de tomarse al menos en dos ocasiones (del mismo grupo de animales), la primera de ellas cuando haya transcurrido un mínimo de 36 horas desde el tratamiento, a intervalos adecuados tras la primera toma, y sin sobrepasar las 72 horas. En el primer momento de muestreo, se tratan todos los grupos de dosis y se toman muestras de todos ellos para su análisis; no obstante, en los momentos de muestreo posteriores, solo es necesario administrar la dosis más alta. Cuando se detecte una respuesta positiva en un momento de muestreo, no será preciso tomar más muestras, a menos que se necesite información cuantitativa dosis-respuesta. Los momentos descritos de toma de muestras son consecuencia de la cinética de aparición y desaparición de los micronúcleos en estos dos compartimentos tisulares.

b. Si se efectúan dos o más administraciones diarias (por ejemplo, dos administraciones a intervalos de 24 horas), han de tomarse muestras en una sola ocasión, transcurridas de 18 a 24 horas desde la última administración si se trata de médula ósea, y de 36 a 48 horas desde la última administración en el caso de la sangre periférica (30). Los momentos descritos de toma de muestras son consecuencia de la cinética de aparición y desaparición de los micronúcleos en estos dos compartimentos tisulares.

c. En caso de que se utilicen tres o más tratamientos diarios (por ejemplo, tres o más administraciones a intervalos de 24 horas, aproximadamente), se recogerán muestras de médula ósea a más tardar 24 horas después del último tratamiento, y las muestras de sangre periférica se tomarán antes de que hayan pasado 40 horas después del último tratamiento (31). Esta opción de tratamiento acomoda la combinación del ensayo de cometa (por ejemplo, muestreo 2-6 horas después del último tratamiento) con el ensayo de micronúcleos, y la integración del ensayo de micronúcleos con estudios de toxicidad por administración continuada. Los datos acumulados sugieren que la inducción de la formación de micronúcleos puede observarse a lo largo de estos períodos más amplios cuando se han efectuado tres o más administraciones (15).

Pueden aplicarse otros regímenes de muestreo o de tratamiento cuando sea pertinente y esté científicamente justificado, y para facilitar la integración con otros ensayos de toxicidad.

**Observaciones**

Deben hacerse observaciones clínicas generales de los animales de ensayo y registrarse los signos clínicos al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período de mayor intensidad de los efectos previstos tras la administración. Al menos dos veces al día durante el periodo de administración, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Deben pesarse todos los animales al principio del estudio, al menos una vez por semana durante los estudios de administración continuada,

▼M7

y en el momento del sacrificio. En los estudios de al menos una semana de duración, el consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. Si el producto problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie el agua y al menos una vez por semana. Los animales que presenten signos de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse de forma compasiva antes de que termine el período del ensayo (28). En determinadas circunstancias, podría comprobarse la temperatura corporal de los animales, dado que la hipotermia y la hipertermia inducidas por el tratamiento se han relacionado con la producción de falsos resultados (32) (33) (34).

**Exposición del tejido diana**

Debe tomarse una muestra de sangre en el momento o momentos adecuados para permitir la investigación de los niveles plasmáticos de los productos problema, a fin de demostrar que ha habido exposición de la médula ósea, cuando esté justificado y cuando no se disponga de otros datos de exposición (véase el punto 48).

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

Por lo general, las células de la médula ósea se extraen del fémur o de la tibia de los animales inmediatamente después de su sacrificio compasivo. Las células suelen tomarse, prepararse y teñirse según métodos establecidos. Pueden obtenerse pequeñas cantidades de sangre periférica, conforme a las normas de bienestar animal adecuadas, bien mediante un método que permita la supervivencia del animal, como el sangrado de la vena caudal o de otro vaso sanguíneo adecuado, o bien por punción cardiaca o extracción de un gran vaso en la eutanasia del animal. Tanto en el caso de eritrocitos tomados de la médula ósea como en el de los procedentes de la sangre periférica, dependiendo del método de análisis, las células pueden someterse inmediatamente a una tinción supravital (16) (17) (18), a la preparación de frotis y luego a tinción para microscopia, o a la fijación y tinción de manera adecuada para análisis por citometría de flujo. Si se emplea un colorante específico del ADN [p. ej., naranja de acridina (35) o Hoechst 33258 más pironina-Y (36)] pueden evitarse algunos de los artefactos que aparecen cuando se utiliza un colorante que no es específico del ADN. Esta ventaja no excluye el uso de tinciones convencionales (por ejemplo, Giemsa para el análisis microscópico). También pueden utilizarse otros sistemas [por ejemplo, columnas de celulosa para eliminar las células nucleadas (37) (38)], siempre que se tenga constancia de que son compatibles con la preparación de las muestras en el laboratorio.

Si estos métodos son aplicables, pueden utilizarse anticuerpos anti-cinetocoros (39), la técnica FISH con sondas pancentroméricas de ADN (40), o el etiquetado *in situ* cebado con cebadores pancentroméricos específicos, junto con una tinción de contraste adecuada del ADN (41), para determinar la naturaleza de los micronúcleos (cromosoma/fragmento cromosómico) a fin de determinar si el mecanismo de inducción de la formación de micronúcleos se debe a actividad clastogénica o aneugénica. Pueden utilizarse otros métodos para diferenciar entre clastógenos y anéugenos, siempre que se haya comprobado que son efectivos.

**Análisis (manual y automatizado)**

Todos los portaobjetos o muestras para el análisis, incluidos los de los testigos positivos y negativos, deben codificarse independientemente antes de cualquier tipo de análisis y aleatorizarse de forma que el examinador manual no tenga conocimiento de cómo se han tratado; esta codificación no es necesaria cuando se utilizan sistemas de examen automatizados que no dependen de la inspección visual y no pueden verse afectados por el sesgo del operador. Para cada animal, se determina la relación entre los eritrocitos inmaduros y el total de eritrocitos (inmaduros + maduros) en un recuento de al menos 500 eritrocitos si se trata de médula ósea y de 2 000 si se trata de sangre periférica (42). Se debe determinar la incidencia de eritrocitos inmaduros micronucleados en un mínimo de 4 000 eritrocitos inmaduros por animal (43). En caso de que la base de datos históricos de testigos negativos indique que la frecuencia media de eritrocitos inmaduros con micronúcleos de fondo es < 0,1 % en el laboratorio de ensayo, debe considerarse el examen de células adicionales. A la hora de analizar las muestras, la

▼M7

proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos en los animales tratados no debe ser inferior al 20 % de la proporción del testigo del vehículo/disolvente cuando se examinan por microscopia, ni al 5 % aproximadamente de la proporción del testigo del vehículo/disolvente cuando se examinan eritrocitos inmaduros positivos para el CD71 por métodos de citometría (véase el punto 31) (29). Por ejemplo, para un ensayo de médula ósea con examen por microscopia, si la proporción de eritrocitos inmaduros en la médula ósea respecto al testigo es del 50 %, el límite superior de toxicidad sería un 10 % de eritrocitos inmaduros.

Debido a que el bazo de la rata secuestra y destruye los eritrocitos micronucleados, para mantener una elevada sensibilidad del ensayo cuando se analiza sangre periférica de rata, es preferible limitar el análisis de eritrocitos inmaduros micronucleados a la fracción más joven. Cuando se utilicen métodos de análisis automatizados, estos eritrocitos más inmaduros podrán identificarse sobre la base de su alto contenido de ARN, o del alto nivel de receptores de transferrina (positivos para el CD71) expresados en su superficie (31). No obstante, la comparación directa de diferentes métodos de tinción ha demostrado que se pueden obtener resultados satisfactorios con diversos métodos, incluyendo la tinción convencional con naranja de acridina (3) (4).

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de cuadro. Con cada animal analizado por separado se relacionará el número de eritrocitos inmaduros examinados, el de eritrocitos inmaduros micronucleados y la proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos. Cuando se tratan ratones de forma continua durante 4 semanas o más, también deben darse los datos sobre el número y la proporción de eritrocitos maduros micronucleados, si se han tomado. Deben también consignarse los datos sobre toxicidad y signos clínicos de los animales.

**Criterios de aceptabilidad**

Los siguientes criterios determinan la aceptabilidad del ensayo:

a. Los datos del testigo negativo en paralelo se consideran aceptables para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio (véanse los puntos 15-18).

b. Los testigos positivos en paralelo o los testigos de examen deben inducir respuestas compatibles con las obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo (véanse los puntos 24-25).

c. Se ha analizado el número adecuado de dosis y células.

d. Los criterios de selección de la concentración más alta son coherentes con los descritos en los puntos 30-33.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si también se cumple lo siguiente:

a. Al menos uno de los grupos de tratamiento presenta un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de eritrocitos inmaduros micronucleados en comparación con el testigo negativo en paralelo,

b. Este aumento está relacionado con la dosis al menos en uno de los momentos de muestreo cuando se evalúan con una prueba de tendencia adecuada, y

c. Alguno de estos resultados está fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson).

▼M7

Si se examina únicamente la dosis más alta en un momento particular de muestreo, el producto problema se considera claramente positivo si se ve un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo y los resultados están fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson). En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (44) (45) (46) (47). Al realizar un análisis de la relación dosis-respuesta, deben someterse al mismo por lo menos tres grupos tratados con dosis diferentes del producto problema. Las pruebas estadísticas deben utilizar como unidad experimental el animal. Un resultado positivo en el ensayo de micronúcleos indica que el producto problema induce la formación de micronúcleos, que son consecuencia de una lesión de los cromosomas o del aparato mitótico de los eritroblastos de la especie estudiada. En caso de que se haya realizado un ensayo para detectar la presencia de centrómeros en los micronúcleos, si el producto produce micronúcleos con centrómeros (ADN centromérico o cinetocoro, que indica la pérdida de cromosomas enteros), queda demostrado que este producto problema es un anéugeno.

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas, también se cumple lo siguiente:

a. Ninguno de los grupos de tratamiento presenta un aumento estadísticamente significativo de la frecuencia de eritrocitos inmaduros micronucleados en comparación con el testigo negativo en paralelo,

b. No hay ningún aumento relacionado con la concentración en ningún momento de muestreo cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

c. Todos los resultados están dentro de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson), y

d. Ha habido exposición de la médula ósea al producto problema.

En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (44) (45) (46) (47). Como pruebas de la exposición de la médula ósea a un producto problema pueden citarse la reducción de la proporción de eritrocitos inmaduros y maduros o la medición de los niveles hemáticos o plasmáticos del producto problema. En caso de administración por vía intravenosa, no hacen falta pruebas de la exposición. Alternativamente, para demostrar la exposición de la médula ósea es posible utilizar los datos de ADME obtenidos en un estudio independiente utilizando la misma vía y la misma especie. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, el producto problema no induce la formación de micronúdeos en los eritrocitos inmaduros de la especie estudiada.

No se requiere ninguna verificación de una respuesta positiva clara o negativa clara.

En los casos en que la respuesta no sea claramente negativa ni positiva y con el fin de ayudar a determinar la importancia biológica de un resultado (por ejemplo, un incremento límite o débil), los datos deben ser evaluados por expertos o hay que completar otras investigaciones de los experimentos existentes. En algunos casos, puede ser de utilidad el análisis de más células o la repetición de un experimento en condiciones experimentales modificadas.

En casos excepcionales, incluso después de otras investigaciones, los datos no permiten concluir si el producto problema produce resultados positivos o negativos, y el estudio deberá considerarse, por tanto, como de resultado dudoso.

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Resumen*

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

▼M7

— estabilidad del producto problema, si se conoce.

*Sustancia con un solo componente:*

— aspecto físico, hidrosolubilidad, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.

*Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas:*

— en la medida de lo posible, caracterizadas por la identidad química (véase más arriba), presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes.

*Preparación del producto problema:*

— justificación de la elección del vehículo;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen;

— preparación de formulaciones para la administración con los alimentos, con el agua de bebida o por inhalación;

— determinaciones analíticas de las formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, concentraciones nominales), si se han llevado a cabo.

*Animales de ensayo:*

— especie y cepa utilizadas y justificación de su utilización;

— número, edad y sexo de los animales;

— origen, condiciones del alojamiento, alimentación, etc.;

— método para la identificación individual de los animales;

— para los estudios de corta duración: peso individual de los animales al inicio y al final del ensayo; para los estudios de más de una semana: pesos corporales individuales durante el estudio y consumo de alimentos; deben incluirse el intervalo, la media y la desviación típica de los pesos corporales de cada grupo.

*Condiciones del ensayo:*

— datos de los testigos positivos y negativos (vehículo o disolvente);

— datos del estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo;

— justificación de la selección de las dosis;

— datos de la formulación del producto problema;

— datos sobre la administración del producto problema;

— fundamento de la elección de la vía de administración y de la duración de esta;

— métodos para verificar que el producto o productos problema han llegado a la circulación general o al tejido diana;

▼M7

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) calculadas a partir del consumo y de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida, en su caso;

— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua;

— método de sacrificio compasivo;

— método de analgesia (en su caso);

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y muestreo y justificación de las decisiones;

— métodos de preparación de los portaobjetos;

— procedimientos de aislamiento y conservación de las muestras;

— métodos de determinación de la toxicidad;

— criterios de examen de los eritrocitos inmaduros micronucleados;

— número de células analizadas por animal para determinar la frecuencia de eritrocitos inmaduros micronucleados y para determinar la proporción de eritrocitos inmaduros y maduros;

— criterios de aceptabilidad del estudio;

— métodos, tales como la utilización de anticuerpos anti-cinetocoro o de sondas de ADN centroméricas específicas, para caracterizar si los micronúcleos contienen cromosomas completos o fragmentados, en su caso.

*Resultados:*

— estado de los animales antes y a lo largo del ensayo, incluidos los signos de toxicidad;

— proporción de eritrocitos inmaduros respecto al total de eritrocitos;

— número de eritrocitos inmaduros micronucleados, indicado en cada animal por separado;

— media ± desviación típica de eritrocitos inmaduros micronucleados de cada grupo;

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible;

— análisis estadísticos y métodos aplicados,

— datos de los testigos negativos y positivos estudiados en paralelo, con intervalos, medias y desviaciones típicas;

— datos históricos de los testigos negativos y positivos, con intervalos, medias y desviaciones típicas y límites de control del 95 % para la distribución, así como el período de tiempo comprendido y el número de puntos de datos;

— datos justificativos de que se ha producido la exposición de la médula ósea;

— datos de caracterización que indiquen si los micronúcleos contienen cromosomas completos o fragmentados, en su caso;

— criterios de respuesta positiva o negativa que se cumplen.

▼**M7**

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

*Referencias*

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Hayashi, M. *et al*. (2007), *in vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 627/1, pp. 10-30.

(3) MacGregor, J.T. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: II. An efficient method of monitoring chromosomal damage in the rat, Toxicology Sciences, Vol. 94/1, pp. 92-107.

(4) Dertinger, S.D. *et al*. (2006), Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring, Toxicological Sciences, Vol. 94/1, pp. 83-91.

(5) Dertinger, S.D. *et al*. (2011), Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing *in vivo* cytogenetic damage, Mutagenesis, Vol. 26/1, pp. 139-145.

(6) Parton, J.W., W.P. Hoffman, M.L. Garriott (1996), Validation of an automated image analysis micronucleus scoring system, Mutation Research, Vol. 370/1, pp. 65-73.

(7) Asano, N. *et al*. (1998), An automated new technique for scoring the rodent micronucleus assay: computerized image analysis of acridine orange supravitally stained peripheral blood cells, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 404/1-2, pp. 149-154.

(8) Styles, J.A. *et al*. (2001), Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry, Cytometry, Vol. 44/2, pp. 153-155.

(9) Heddle, J.A. (1973), A rapid *in vivo* test for chromosomal damage, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 18/2, pp. 187-190.

(10) Schmid, W. (1975), The micronucleus test, Mutation Research, Vol. 31/1, pp. 9-15.

(11) Heddle, J.A. *et al*. (1983), The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 123/1, pp. 61-118.

(12) Mavournin, K.H. *et al*. (1990), The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, Vol. 239/1, pp. 29-80.

(13) MacGregor, J.T. *et al*. (1983), Micronuclei in circulating erythrocytes: a rapid screen for chromosomal damage during routine toxicity testing in mice, Developments in Toxicology Environmental Science, Vol. 11, pp. 555-558.

▼M7

(14) MacGregor, J.T. *et al*. (1987), Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 189/2, pp. 103-112.

(15) MacGregor, J.T. *et al*. (1990), The *in vivo* erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies, Fundamental and Applied Toxicology, Vol. 14/3, pp. 513-522.

(16) Hayashi, M. *et al*. (1990), The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides, Mutation Research/ Genetic Toxicology, Vol. 245/4, pp. 245-249.

(17) CSGMT/JEMS.MMS — The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992), Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study, Mutation Research/Genetic Toxicology, Vol. 278/2-3, pp. 83-98.

(18) CSGMT/JEMS.MMS — The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan (1995), Protocol recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan), Mutagenesis, Vol. 10/3, pp. 153-159.

(19) Salamone, M.F., K.H. Mavournin (1994), Bone marrow micronucleus assay: a review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 23/4, pp. 239-273.

(20) Krishna, G., G. Urda, J. Paulissen (2000), Historical vehicle and positive control micronucleus data in mice and rats, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 453/1, pp. 45-50.

(21) Hayes, J. *et al*. (2009), The rat bone marrow micronucleus test–study design and statistical power, Mutagenesis, Vol. 24/5, pp. 419-424.

(22) Wakata, A. *et al*. (1998), Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 32/1, pp. 84-100.

(23) Ryan, T.P. (2000), Statistical Methods for Quality Improvement, 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(24) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(25) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 723/2, pp. 108-120.

(26) Hayashi, M. *et al*. (1994), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, Vol. 312/3, pp. 293-304.

(27) Fielder, R.J. *et al*. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group. Dose setting in *in vivo* mutagenicity assays, Mutagenesis, Vol. 7/5, pp. 313-319.

▼**M7**

(28) OCDE (2000), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(29) LeBaron, M.J. *et al*. (2013), Influence of counting methodology on erythrocyte ratios in the mouse micronucleus test, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 54/3, pp. 222-228.

(30) Higashikuni, N., S. Sutou (1995), An optimal, generalized sampling time of 30 +/- 6 h after double dosing in the mouse peripheral blood micronucleus test, Mutagenesis, Vol. 10/4, pp. 313-319.

(31) Hayashi, M. *et al*. (2000), *in vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring, Environmental and Molecular Mutagenesis, Vol. 35/3, pp. 234-252.

(32) Asanami, S., K. Shimono (1997), High body temperature induces micronuclei in mouse bone marrow, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 390/1-2, pp. 79-83.

(33) Asanami, S., K. Shimono, S. Kaneda (1998), Transient hypothermia induces micronuclei in mice, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 413/1, pp. 7-14.

(34) Spencer, P.J. *et al*. (2007), Induction of micronuclei by phenol in the mouse bone marrow: I. Association with chemically induced hypothermia, Toxicological Sciences, Vol. 97/1, pp. 120-127.

(35) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983), An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test, Mutation Research Letters, Vol. 120/4, pp. 241-247.

(36) MacGregor, J.T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983), A simple fluorescent staining procedure for micronuclei and RNA in erythrocytes using Hoechst 33258 and pyronin Y, Mutation Research, Vol. 120/4, pp. 269-275.

(37) Romagna, F., C.D. Staniforth (1989), The automated bone marrow micronucleus test, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Vol. 213/1, pp. 91-104.

(38) Sun, J.T., M.J. Armstrong, S.M. Galloway (1999), Rapid method for improving slide quality in the bone marrow micronucleus assay; an adapted cellulose column procedure, Mutation Research, Vol. 439/1, pp. 121-126.

(39) Miller, B.M., I.D. Adler (1990), Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced *in vivo*, Mutagenesis, Vol. 5/4, pp. 411-415.

(40) Miller, B.M. *et al*. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to in situ hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, Mutagenesis, Vol. 6/4, pp. 297-302.

(41) Russo, A. (2002), PRINS tandem labeling of satellite DNA in the study of chromosome damage, American Journal of Medical Genetics, Vol. 107/2, pp. 99-104.

(42) Gollapudi, B.B., L.G. McFadden (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Research, Vol. 347/2, pp. 97-99.

(43) OCDE (2014), «Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 198, OECD Publishing, Paris.

▼**M7**

(44) Richold, M. *et al*. (1990), «In Vivo Cytogenetics Assays», in Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 115-141.

(45) Lovell, D.P. *et al*. (1989), «Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays», in Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III, Kirkland, D.J. (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 184-232.

(46) Hayashi, M. *et al*. (1994), Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay, Environmental Health Perspectives, Vol. 102/Suppl 1, pp. 49-52.

(47) Kim, B.S., M. Cho, H.J. Kim (2000), Statistical analysis of *in vivo* rodent micronucleus assay, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 469/2, pp. 233-241.

▼**M7**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Centrómero**: Región o regiones del cromosoma con las que se asocian las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Eritroblasto**: Fase temprana de desarrollo de los eritrocitos, que precede inmediatamente a la de eritrocitos inmaduros, cuando la célula aún tiene núcleo.

**Cinetocoro**: Estructura proteínica que se forma en el centrómero de las células eucarióticas, que vincula el cromosoma a los polímeros del microtúbulo del huso mitótico durante la mitosis y la meiosis y sirve para separar las cromátidas hermanas durante la división celular.

**Micronúcleos**: Núcleos pequeños, adicionales a los núcleos celulares principales y separados de ellos, y producidos durante la telofase de la mitosis (o la meiosis) por fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros retardados.

**Eritrocito normocromático o maduro**: Eritrocito completamente madurado que ha perdido el ARN residual que queda tras la desnucleación o ha perdido otros marcadores celulares de vida corta que desaparecen típicamente tras la desnucleación que tiene lugar después de la división final del eritroblasto.

**Eritrocito policromático o inmaduro**: Eritrocito recién formado en una fase intermedia de desarrollo, que se tiñe con los componentes tanto de color azul como de color rojo de las tinciones clásicas de sangre, como la de Wright-Giemsa, debido a la presencia de ARN residual en las células recién formadas. Estas células recién formadas son aproximadamente lo mismo que los reticulocitos, los cuales se visualizan utilizando una tinción vital que hace que el ARN residual se aglutine en un retículo. Para identificar los glóbulos rojos recién formados se suelen utilizar ahora otros métodos, como la tinción monocromática de ARN con colorantes fluorescentes o el etiquetado de marcadores de superficie de vida corta como el CD71 con anticuerpos fluorescentes. Los eritrocitos policromáticos, los reticulocitos y los eritrocitos positivos para el CD71 son todos eritrocitos inmaduros, aunque cada uno de ellos tiene una distribución por edades algo diferente.

**Reticulocito**: Eritrocito recién formado teñido con una tinción vital que hace que el ARN celular residual se aglutine en un retículo característico. Los reticulocitos y los eritrocitos policromáticos tienen una distribución similar por edades celulares.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M7

*Apéndice 2*

## DISEÑO FACTORIAL PARA IDENTIFICAR LAS DIFERENCIAS DE SEXO EN EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS *IN VIVO*

### Diseño factorial y su análisis

En este diseño, un mínimo de 5 machos y 5 hembras se someten a ensayo a cada concentración, lo que resulta en la utilización de un mínimo de 40 animales (20 machos y 20 hembras, más los testigos positivos pertinentes).

Este diseño, que es uno de los diseños factoriales más simples, es equivalente a un análisis de varianza de dos factores, con el sexo y el nivel de concentración como efectos principales. Los datos pueden analizarse con numerosos paquetes de software estadístico estándar tales como SPSS, SAS, STATA, Genstat, así como utilizando R.

El análisis divide la variabilidad de la serie de datos en la variabilidad entre sexos, la variabilidad entre las concentraciones y la relativa a la interacción entre los sexos y las concentraciones. Cada uno de los términos se somete a prueba frente a una estimación de la variabilidad entre los animales replicados dentro de los grupos de animales del mismo sexo que han recibido la misma concentración. Todos los detalles de la metodología subyacente se encuentran en muchos manuales estadísticos conocidos (véanse las referencias) y en las funciones de «ayuda» de los paquetes estadísticos.

El análisis se lleva a cabo inspeccionando el término de la interacción sexo x concentración en el cuadro de ANOVA ([1]). A falta de un término de interacción significativo, los valores combinados de distintos sexos o niveles de concentración ofrecen pruebas estadísticas válidas entre los niveles, sobre la base del término de ANOVA de variabilidad intragrupo puesta en común.

El análisis continúa dividiendo la estimación de la variabilidad entre concentraciones en contrastes que permiten una prueba de contrastes lineales y cuadráticos de las respuestas a través de los niveles de concentración. Cuando existe un término de interacción significativa sexo x concentración, este término también puede dividirse en contrastes de interacción lineal x sexo y cuadrático x sexo. Estos términos permiten pruebas de si las respuestas a la concentración son paralelas en los dos sexos, o si existe una diferencia en la respuesta entre estos.

La estimación de la variabilidad intragrupo puesta en común se puede utilizar para proporcionar pruebas pareadas de la diferencia entre medias. Estas comparaciones podrían realizarse entre las medias para los dos sexos y entre las medias para los diferentes niveles de concentración, así como para las comparaciones con los niveles de los testigos negativos. En los casos en los que existe una interacción significativa pueden hacerse comparaciones entre las medias de concentraciones diferentes dentro de un sexo o entre las medias de los sexos a la misma concentración.

### Bibliografía

Hay muchos manuales estadísticos que debaten la teoría, el diseño, la metodología, el análisis y la interpretación de los diseños factoriales que van desde los análisis bifactoriales más sencillos hasta las formas más complejas utilizadas en la metodología de «diseño de experimentos». La lista que sigue no es exhaustiva. Algunos libros proporcionan ejemplos resueltos de diseños comparables, en algunos casos con el código para aplicar los análisis utilizando diversos paquetes de software.

([1]) Los estadísticos que siguen un enfoque de modelización como el de usar modelos lineales generales pueden plantear el análisis de forma diferente, pero comparable, sin derivar necesariamente el cuadro tradicional de ANOVA, que se basa en enfoques algorítmicos para calcular las estadísticas elaboradas en una edad pre-informática.

▼**M7**

Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987). Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007). Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

Mead, R. (1990). The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

Montgomery D.C. (1997). Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

Winer, B.J. (1971). Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009). Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼B

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

1. **MÉTODO**

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

1.1. INTRODUCCIÓN

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

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

Véase asimismo la introducción general de la parte B.

1.2. DEFINICIONES

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

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

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

▼B

1.3. CONSIDERACIONES INICIALES

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

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

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

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

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

▼B

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

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Preparación**

1.5.1.1. *Bacterias*

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

La temperatura de incubación recomendada es de 37 °C.

Se emplearán al menos cinco cepas bacterianas, de las cuales cuatro serán de *S. typhimurium* (TA1535; TA 1537, TA97a o TA97; TA98 y TA100), de fiabilidad demostrada y cuya respuesta sea reproducible entre laboratorios. Esas cuatro cepas de *S. typhimurium* poseen pares de bases GC en el sitio de reversión primaria y se sabe que no son capaces de detectar determinados mutágenos oxidantes, agentes de entrecruzamiento e hidracinas. Dichas sustancias son detectadas por las cepas *E. coli* WP2 y *S. typhimurium* TA102 (19), que poseen un par de bases AT en el sitio de reversión primaria. Así pues, se recomienda la combinación de cepas siguiente.

— *S. typhimurium* TA1535, y

— *S. typhimurium* TA1537 y TA97 o TA97a, y

— *S. typhimurium* TA98, y

— *S. typhimurium* TA100, y

— *E. coli* WP2 uvrA o *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) o *S. typhimurium* TA102.

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

▼B

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

1.5.1.2. *Medio*

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

1.5.1.3. *Activación metabólica*

Las bacterias deben exponerse a la sustancia de ensayo en presencia y en ausencia de un sistema adecuado de activación metabólica. El sistema más comúnmente empleado es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene de hígados de roedores tratados con inductores enzimáticos como el Aroclor 1254 (1) (2) o una mezcla de fenobarbital y $\beta$-naftoflavona (18) (20) (21). La fracción postmitocondrial suele emplearse en concentraciones que varían del 5 al 30 % v/v en la mezcla S9. La elección y la condición de un sistema de activación metabólica puede depender de la clase de sustancia estudiada. En algunos casos puede ser oportuno utilizar varias concentraciones distintas de fracción postmitocondrial. En el caso de los azocolorantes y los diazocompuestos puede estar más indicado utilizar un sistema reductor de activación metabólica (6) (1 3).

1.5.1.4. *Preparación de la sustancia de ensayo*

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

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

▼B

1.5.2. **Condiciones de ensayo**

1.5.2.1. *Cepas de ensayo (véase el punto 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Concentraciones de exposición*

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

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

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

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

1.5.2.3. *Controles positivos y negativos*

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

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

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

| N° CAS | N° Einecs | Sustancia |
|---|---|---|
| 781-43-1 | 212-308-4 | 9,10-Dimetilantraceno |
| 57-97-6 | 200-359-5 | 7,12-Dimetilbenzo[a]aniraceno |
| 50-32-8 | 200-028-5 | Benzo[a]pireno |
| 613-13-8 | 210-330-9 | 2-Aminoantraceno |

▼B

| N° CAS | N° Einecs | Sustancia |
|---|---|---|
| 50-18-0 | | Ciclofosfamida |
| 6055-19-2 | 200-015-4 | Monohidrato de ciclofosfamida |

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

| Sustancia | N° CAS | N° Einecs |
|---|---|---|
| Rojo Congo | 573-58-0 | 209-358-4 |

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

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

| N° CAS | N° Einecs | Sustancia | Cepa |
|---|---|---|---|
| 26628-22-8 | 247-852-1 | Azida de sodio | TA 1535 yTA 100 |
| 607-57-8 | 210-138-5 | 2-Nitrofluoreno | TA 98 |
| 90-45-9 | 201-995-6 | 9-Aminoacridina | TA 1537, TA 97 y TA 97a |
| 17070-45-0 | 241-129-4 | ICR 191 | TA 1537, TA 97 y TA 97a |
| 80-15-9 | 201-254-7 | Hidroperóxido de cumeno | TA 102 |
| 50-07-7 | 200-008-6 | Mitomicina C | WP2uvrA y TA 102 |
| 70-25-7 | 200-730-1 | N-etil-N-nitro-N-nitroso-guanidina | WP2, WP2uvrA y WP2uv-rA(pKM101) |
| 56-57-5 | 200-281-1 | 4-Nitroquinolina-l-óxido | WP2, WP2uvrA y WP2uv-rA(pKM101) |
| 3688-53-7 | | Furilfuramida (AF2) | Cepas que contengan plásmidos |

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

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

▼B

1.5.3. **Procedimiento**

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

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

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

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

1.5.4. **Incubación**

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

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

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

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

▼B

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

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

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

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

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del disolvente o vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Cepas:

— cepas utilizadas,

— número de células por cultivo,

— características de las cepas.

Condiciones del ensayo:

— cantidad de sustancia de ensayo por placa (mg/placa o µl/placa), fundamento de la selección de las dosis y número de placas por concentración,

— medios utilizados,

— tipo y composición del sistema de activación metabólica, incluidos los criterios de aceptabilidad,

— procedimientos de tratamiento.

Resultados:

— signos de toxicidad,

— signos de precipitación,

— recuentos por placa,

▼B

— cantidad media de colonias revertientes por placa y desviación estándar,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— análisis estadísticos, si se han realizado,

— datos de los controles negativos (disolvente/vehículo) y positivos realizados en paralelo, intervalos, medias y desviaciones estándar,

— datos sobre controles históricos negativos (disolvente/vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Ames, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 31, pp. 347-364.

(2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.,* 113, pp. 173-215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.,* 312, pp. 217-233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V., F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The *Salmonella* typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.,* 168, pp. 69-240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y.Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters, 1,* pp. 91-96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens,* ed. Norpoth K. H. and Garner, R. C Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273-285.

(7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Pan* 1 *Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13-61.

(8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *J. Food Safety,* S, pp, 167-177.

(9) Green, M. H. L, Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutations Res., 38,* pp. 33-42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L, Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures,* 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141-161.

▼B

(11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium, Environmental Mutagenesis, 3,* pp. 453-465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res., 307,* pp. 335-344.

(13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D, and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, *Mutation* Res., *136,* pp. 33-47.

(14) Zeiger, E., Anderson B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mulagen., 19,* pp. 2-141.

(15) Simmon, V., Kauhanen K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology,* D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249-258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, *Environmental Mutagenesis, 9,* pp. 421-441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. and Sugimura T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugales in *Salomonella typhimurium, Cancer Res.,* 39, pp, 3780-3782,

(18) Tamura, G., Gold, C, Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77,* pp. 4961-4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with E*scherichia coli* WP2 Tester strains, *Mulagenesis,* 5, pp. 285-291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: In vitro *Metabolic Activation in Mutagenesis Testing,* eds, F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85-88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Tatehouse, D. G., Gibson, G, G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis,* 7, pp. 175-177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/Microsome Test, *Mulalion Res., 88,* pp. 343-350.

(23) Claxton, L. D., Allen J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res., 189,* pp. 83-91.

▼B

(24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchell, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: *UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mulagenicity Testing, Part II. Slatistical Evaluation of Mutagenicity Test Data,* ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28-65.

▼M7

_____

_____

▼M8

## B.17 ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO* UTILIZANDO LOS GENES HPRT Y XPRT

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 476 de la OCDE (2016). Los métodos de ensayo se revisan periódicamente a la luz del progreso científico, los cambios en las necesidades normativas y el bienestar animal. La presente versión actualizada del método de ensayo B.17 refleja casi treinta años de experiencia con este ensayo y también es resultado del desarrollo de una nuevo método aparte dedicado a los ensayos de mutación génica de células de mamífero *in vitro* utilizando el gen de la timidina-cinasa. El método B.17 forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. La OCDE ha elaborado un documento que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a las directrices de ensayo de la OCDE sobre toxicidad genética (1).

2. El objetivo del ensayo de mutación génica de células de mamífero es detectar las mutaciones génicas inducidas por los productos. Las líneas celulares utilizadas en estos ensayos miden las mutaciones directas de genes marcadores, en concreto el gen endógeno de la hipoxantina-guanina-fosfo-ribosiltransferasa (Hprt en células de roedor, HPRT en células humanas; denominado colectivamente gen Hprt y ensayo HPRT en el presente método de ensayo) y el transgén de la xantina-guanina-fosfo-ribosil-transferasa (gpt) (denominado ensayo XPRT). Los ensayos de mutación HPRT y XPRT detectan diversos espectros de fenómenos genéticos. Además de los fenómenos mutacionales detectados por el ensayo HPRT (p. ej., sustituciones de pares de bases, desplazamientos del marco de lectura, pequeñas supresiones e inserciones), la localización autosómica del transgén gpt puede permitir la detección de mutaciones resultantes de grandes supresiones y recombinaciones posiblemente mitóticas no detectadas por el ensayo HPRT porque el gen Hprt se encuentra en el cromosoma X (2) (3) (4) (5) (6) (7). El ensayo XPRT se utiliza actualmente con menor frecuencia que el ensayo HPRT con fines normativos.

3. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. Los ensayos efectuados *in vitro* requieren generalmente el uso de una fuente exógena de activación metabólica. El sistema exógeno de activación metabólica no reproduce completamente las condiciones *in vivo*.

5. Hay que procurar evitar las condiciones que lleven a la producción de resultados positivos que sean artefactos (es decir, debidos a la posible interacción con el sistema de ensayo), no causados por la interacción directa entre los productos problema y el material genético de la célula; pueden mencionarse entre tales condiciones los cambios de pH o de osmolalidad (8) (9) (10), la interacción con los componentes del medio (11) (12), o unos niveles excesivos de citotoxicidad (13). Se considera excesiva para el ensayo HPRT la citotoxicidad que supere los niveles máximos recomendados de citotoxicidad que se definen en el punto 19.

▼M8

6. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la normativa impone el ensayo de la mezcla.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Las células mutantes deficientes en actividad de la enzima Hprt en el ensayo HPRT o de la enzima xprt en el ensayo XPRT son resistentes a los efectos citostáticos de la 6-tioguanina (TG), análogo de la purina. Las células capaces de producir Hprt (en el ensayo HPRT) o gpt (en el ensayo XPRT) son sensibles a la TG, que provoca la inhibición del metabolismo celular y detiene la división celular. Así pues, las células mutantes son capaces de proliferar en presencia de TG, mientras que no lo son las células normales, que contienen la enzima Hprt (en el ensayo HPRT) o gpt (en el ensayo XPRT).

8. Se exponen al producto problema células en suspensión o en cultivos monocapa, tanto en presencia como en ausencia de una fuente exógena de activación metabólica (véase el punto14), durante un plazo adecuado (3-6 horas), y después se subcultivan para determinar la citotoxicidad y permitir la expresión fenotípica antes de la selección de los mutantes (14) (15) (16) (17). La citotoxicidad se determina mediante la supervivencia relativa, es decir, la eficiencia de clonación medida inmediatamente después del tratamiento y ajustada para tener en cuenta la eventual pérdida de células durante el tratamiento respecto al testigo negativo (punto 18 y apéndice 2). Los cultivos tratados se mantienen en un medio de crecimiento durante un plazo suficiente, específico para cada tipo celular, de manera que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas sea casi óptima (normalmente un mínimo de 7-9 días). Tras la expresión fenotípica, la frecuencia de mutantes se determina sembrando un número conocido de células en un medio con el agente selectivo para detectar las colonias de mutantes, y en otro medio sin dicho agente para determinar la eficiencia de clonación (viabilidad). Tras un período de incubación adecuado, se cuentan las colonias. La frecuencia de mutantes se calcula en función del número de colonias de mutantes, corregido para tener en cuenta la eficiencia de clonación, en el momento de la selección de los mutantes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparaciones**

*Células*

9. Las células utilizadas en los ensayos HPRT y XPRT deben haber demostrado su sensibilidad a los mutágenos químicos, una elevada eficiencia de clonación, un cariotipo estable, y una frecuencia estable de mutantes espontáneos. Entre las células utilizadas con mayor frecuencia para el ensayo HPRT se incluyen las líneas CHO, CHL y V79 de hámster chino, las células de linfoma de ratón L5178Y, y las células linfoblastoides humanas TK6 (18) (19). Para el ensayo XPRT se utilizan células AS52 derivadas de CHO con el transgén gpt (y de las que se ha suprimido el gen Hprt) (20) (21); el ensayo HPRT no puede realizarse con células AS52 porque en ellas se ha suprimido el gen Hprt. Debe justificarse y validarse el eventual uso de otras líneas celulares.

10. Las líneas celulares deben examinarse sistemáticamente para comprobar la estabilidad del número modal de cromosomas y la ausencia de contaminación por *Mycoplasma* (22) (23), y no deben utilizarse las células que estén contaminadas o que presenten un cambio en el número modal de cromosomas. Debe determinarse la duración del ciclo celular normal utilizada en el

▼M8

laboratorio de ensayo, la cual debe ser coherente con las características celulares publicadas. También ha de comprobarse la frecuencia de mutantes espontáneos en el cultivo celular madre, y este no debe utilizarse si la frecuencia de mutantes no es aceptable.

11. Antes de emplear un cultivo en este ensayo, es necesario limpiarlo de células mutantes preexistentes, p. ej. cultivándolo en medio HAT en caso de ensayo HPRT y en MPA en caso de ensayo XPRT (5) (24) (véase el apéndice 1). Las células limpiadas pueden crioconservarse y después descongelarse para utilizarse como cultivos de trabajo. Los cultivos de trabajo recién descongelados pueden utilizarse para el ensayo después de que se consigan tiempos normales de duplicación. Al efectuar el ensayo XPRT, el cultivo sistemático de las células AS52 debe hacerse en unas condiciones que garanticen el mantenimiento del transgén gpt (20).

**Medios y condiciones de cultivo**

12. Para el mantenimiento de los cultivos deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (recipientes de cultivo, atmósfera humidificada con 5 % de $CO_2$, y temperatura de incubación de 37 °C). Los cultivos celulares deben mantenerse siempre en condiciones que garanticen que se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. Es especialmente importante elegir medios y condiciones de cultivo que garanticen un crecimiento celular óptimo durante el período de expresión y una eficiencia de clonación óptima de las células, tanto mutantes como no mutantes.

**Preparación de los cultivos**

13. Las líneas celulares se propagan a partir de cultivos madre, y se siembran en medio de cultivo a una densidad tal que las células en suspensión o en monocapas sigan creciendo exponencialmente a lo largo del tratamiento y del período de expresión (p. ej., debe evitarse la confluencia de las células que crecen en monocapas).

**Activación metabólica**

14. Se debe recurrir a sistemas exógenos de metabolización cuando se utilicen células con una capacidad metabólica endógena inadecuada. El sistema utilizado con más frecuencia que se recomienda por defecto, salvo en casos justificados, es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene a partir del hígado de roedores (generalmente ratas) tratados con inductores enzimáticos como el aroclor 1254 (25) (26) (27) (28) o una combinación de fenobarbital y β-naftoflavona (29) (30) (31) (32). Esta última combinación no infringe el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (33), y se ha visto que es tan efectiva como el aroclor 1254 para inducir oxidasas de función mixta (29) (31). La fracción S9 se utiliza normalmente a concentraciones que varían entre el 1 y el 2 % (v/v), pero pueden aumentarse hasta el 10 % (v/v) en el medio de ensayo final. La elección del tipo y de la concentración del sistema exógeno de activación metabólica o del inductor metabólico utilizado puede estar influida por la clase de las sustancias que se someten al ensayo (34) (35) (36).

**Preparación del producto problema**

15. Los productos problema sólidos deben prepararse en disolventes adecuados y, si es conveniente, diluirse antes de tratar las células (véase el punto 16). Los productos problema líquidos pueden añadirse directamente al sistema de ensayo o diluirse antes del tratamiento del sistema de ensayo. Los productos problema gaseosos o volátiles deben someterse a ensayo aplicando modificaciones adecuadas a los protocolos normales, tales como el tratamiento en recipientes de cultivo sellados (37) (38). La preparación del producto problema debe hacerse justo antes del tratamiento, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación.

▼M8

CONDICIONES DE ENSAYO

**Disolventes**

16. El disolvente debe elegirse para optimizar la solubilidad de los productos problema sin tener un impacto negativo en la realización del ensayo, por ejemplo por cambiar el crecimiento celular, afectar a la integridad del producto problema, reaccionar con los recipientes de cultivo o interferir con el sistema de activación metabólica. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente (o medio de cultivo) acuoso. Son ejemplos de disolventes bien establecidos el agua y el dimetilsulfóxido. En general, los disolventes orgánicos no deben exceder del 1 % (v/v) y los disolventes acuosos (solución salina o agua) no deben superar el 10 % (v/v) en el medio de tratamiento final. Si los disolventes utilizados no están bien establecidos (por ejemplo, etanol o acetona), debe disponerse de datos justificativos que indiquen su compatibilidad con el sistema de ensayo y los productos problema, así como su ausencia de toxicidad genética a la concentración utilizada. En ausencia de estos datos justificativos, es importante añadir testigos sin tratar (véase el apéndice 1) para demostrar que el disolvente elegido no es nocivo ni induce efectos mutagénicos.

**Medición de la citotoxicidad y selección de las concentraciones de exposición**

17. Al determinar la concentración máxima de producto problema, debe evitarse llegar a concentraciones que puedan producir respuestas positivas que sean artefactos, tales como las que provocan una citotoxicidad excesiva (véase el punto 20), precipitación en el medio de cultivo (véase el punto 21), o cambios marcados del pH o de la osmolalidad (véase el punto 5). Si el producto problema provoca un cambio marcado en el pH del medio en el momento de su adición, el pH puede ajustarse amortiguando el medio de tratamiento final para evitar resultados positivos que sean artefactos y mantener unas condiciones de cultivo adecuadas.

18. La selección de las concentraciones se basa en la citotoxicidad y en otras consideraciones (véanse los puntos 20-22). Si bien la evaluación de la citotoxicidad en un ensayo inicial puede ser útil para definir mejor las concentraciones que deben utilizarse en el experimento principal, no es obligatorio efectuar ese ensayo inicial. Incluso aunque se realice una evaluación inicial de la citotoxicidad, sigue siendo necesario medir la citotoxicidad en cada cultivo del experimento principal, La citotoxicidad debe evaluarse utilizando la supervivencia relativa, es decir, la eficiencia de clonación de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta las eventuales pérdidas de células durante el tratamiento, sobre la base del recuento celular, frente a la eficiencia de clonación ajustada de los testigos negativos (a los que se asigna una supervivencia del 100 %) (véase la fórmula en el apéndice 2).

19. Deben evaluarse al menos cuatro concentraciones de ensayo (sin incluir los testigos positivos y de disolvente) que cumplan los criterios de aceptabilidad (citotoxicidad apropiada, número de células, etc.). Si bien es aconsejable utilizar cultivos duplicados, a cada concentración estudiada podrán utilizarse cultivos tratados bien replicados o bien únicos. Los resultados obtenidos en los cultivos replicados independientes a una concentración determinada deben comunicarse por separado, pero pueden agruparse para el análisis de datos (17). En el caso de productos problema que muestren escasa o nula citotoxicidad, normalmente serán adecuados los intervalos de concentración de aproximadamente el doble o el triple. Si se produce citotoxicidad, las concentraciones de ensayo seleccionadas deben abarcar una gama de concentraciones desde la que produce citotoxicidad hasta aquellas a las que la citotoxicidad es moderada y pequeña o nula. Muchos productos problema presentan curvas concentración-respuesta de elevada pendiente y, a fin de

▼M8

abarcar todo el intervalo de citotoxicidad o de estudiar la relación concentración-respuesta en detalle, puede ser necesario utilizar concentraciones más próximas entre sí y en un número superior a cuatro, en particular en situaciones en las que se requiera repetir un experimento (véase el punto 43). La utilización de más de cuatro concentraciones puede ser especialmente importante si se utilizan cultivos únicos.

20. Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, la concentración más elevada debe intentar conseguir una supervivencia relativa de entre el 20 y el 10 %. Hay que tener cuidado al interpretar los resultados positivos que solo se encuentren con una supervivencia relativa inferior o igual al 10 % (punto 43).

21. Con productos problema poco solubles que no son citotóxicos a concentraciones inferiores a la concentración mínima insoluble, la mayor concentración analizada debe producir turbidez o precipitado visibles a simple vista o con ayuda de un microscopio invertido al final del tratamiento con el producto problema. Incluso si se produce citotoxicidad por encima de la concentración mínima insoluble, es aconsejable hacer el ensayo a una única concentración que produzca turbidez o precipitado visible porque este puede provocar efectos que sean artefactos. A la concentración a la que se produzca un precipitado, hay que tener cuidado para que el precipitado no interfiera con la realización del ensayo. Puede ser útil determinar la solubilidad en el medio de cultivo antes de efectuar el experimento.

22. Si no se observa precipitado ni citotoxicidad limitante, la concentración de ensayo más elevada debe corresponder a la más baja de las siguientes: 10 mM, 2 mg/ml o 2 μl/ml (39) (40). Cuando el producto problema no tenga una composición definida y se trate, p. ej., de una sustancia de composición desconocida o variable, de productos complejos de reacción o de materiales biológicos [es decir, sustancias de composición desconocida o variable (UVCB)] (41), extractos medioambientales, etc., es posible que la concentración superior tenga que ser mayor (p. ej., 5 mg/ml), en ausencia de citotoxicidad suficiente, para aumentar la concentración de cada uno de los componentes. Conviene señalar, no obstante, que estos requisitos pueden variar en caso de medicamentos de uso humano (42).

**Testigos**

23. Se incluirán, para cada condición experimental, testigos negativos en paralelo (véase el punto 16), consistentes en el disolvente solo en el medio de tratamiento y manipulados de la misma manera que los cultivos tratados.

24. Es necesario disponer de testigos positivos en paralelo a fin de demostrar la capacidad del laboratorio para detectar mutágenos en las condiciones establecidas en el protocolo de ensayo utilizado y la efectividad del sistema exógeno de activación metabólica, si procede. En el cuadro 1 a continuación se encuentran ejemplos de testigos positivos. Es posible utilizar como testigos positivos otras sustancias, si se justifica. Dado que los ensayos de toxicidad genética con células de mamífero *in vitro* están suficientemente normalizados, es posible realizar ensayos que utilicen tratamientos con y sin activación metabólica exógena empleando únicamente un testigo positivo que requiera activación metabólica. En este caso, una respuesta de este único testigo positivo demostrará tanto la actividad del sistema de activación metabólica como la sensibilidad del sistema de ensayo. Cada testigo positivo debe utilizarse a una o varias concentraciones de las que se espera que den un aumento reproducible y detectable respecto al nivel de fondo, a fin de demostrar la sensibilidad del sistema de ensayo, y la respuesta no debe ponerse en peligro por una citotoxicidad que supere los límites especificados en el presente método de ensayo (véase el punto 20).

▼M8

*Cuadro 1*

**Sustancias de referencia recomendadas para evaluar la competencia del laboratorio y parala selección de los testigos positivos**

| Activación metabólica | Locus | Sustancia y n.º CAS |
|---|---|---|
| Ausencia de activación metabólica exógena | *Hprt* | Metanosulfonato de etilo [n.º CAS 62-50-0] Etilnitrosourea [n.º CAS 759-73-9] 1-óxido de 4-nitroquinolina [n.º CAS 56-57-5] |
| | *xprt* | Estreptonigrina [n.º CAS 3930-19-6] Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7] |
| Presencia de activación metabólica exógena | *Hprt* | 3-Metilcolantreno [n.º CAS 56-49-5] 7,12-Dimetilbenzantraceno [n.º CAS 57-97-6] Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8] |
| | *xprt* | Benzo[a]pireno [n.º CAS 50-32-8] |

PROCEDIMIENTO

**Tratamiento con el producto problema**

25. Se tratan células en crecimiento con el producto problema en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. La exposición debe durar un plazo de tiempo adecuado (generalmente de 3 a 6 horas).

26. El número mínimo de células utilizadas para cada cultivo de ensayo (testigo y tratado) en cada fase del ensayo debe basarse en la frecuencia de mutantes espontáneos. Como guía general, hay que tratar y cultivar células suficientes como para mantener 10 mutantes espontáneos en cada cultivo en todas las fases del ensayo (17). La frecuencia de mutantes espontáneos suele estar entre 5 y 20 × $10^{-6}$. Con una frecuencia de mutantes espontáneos de 5 × $10^{-6}$ y para mantener un número suficiente de mutantes espontáneos (10 o más), incluso en el caso de los cultivos tratados a concentraciones que den lugar a una citotoxicidad del 90 % durante el tratamiento (10 % supervivencia relativa), sería necesario tratar al menos 20 × $10^{6}$ células. Además, debe cultivarse durante el período de expresión un número suficiente de células (pero nunca menos de 2 × $10^{6}$), y sembrarse para la selección de mutantes (17).

**Período de expresión fenotípica y medición de la frecuencia de mutantes**

27. Tras el período de tratamiento, las células se cultivan para que se pueda expresar el fenotipo mutante. Un mínimo de 7 a 9 días es, en general, suficiente para permitir una expresión fenotípica casi óptima de los mutantes Hprt y xprt recién inducidos (43) (44). Durante este período, las células se subcultivan periódicamente para mantenerlas en crecimiento exponencial. Después de la expresión fenotípica, las células se vuelven a sembrar en medio con y sin agente selectivo (6-tioguanina) para determinar el número de mutantes y la eficiencia de clonación en el momento de la selección, respectivamente. Esta siembra se puede llevar a cabo utilizando placas Petri para cultivos monocapa o placas de micropocillos para células en suspensión. Para la selección de mutantes, las células deben sembrarse a una densidad que garantice la recuperación óptima de los mutantes (es decir, evitar la cooperación metabólica) (17). Las placas se incuban durante el tiempo adecuado para lograr un crecimiento óptimo de las colonias (por ejemplo, 7-12 días) y después se cuentan estas. La frecuencia de mutantes se calcula a partir del número de colonias mutantes corregido según la eficiencia de clonación en el momento de la selección de mutantes (véanse las fórmulas en el apéndice 2).

▼M8

**Competencia del laboratorio**

28. Con el fin de conseguir la suficiente experiencia con el ensayo antes de su uso para los ensayos sistemáticos, el laboratorio debe haber efectuado una serie de experimentos con sustancias positivas de referencia que actúen a través de mecanismos diferentes (como mínimo, una activa con activación metabólica y otra activa sin ella, seleccionadas de entre las sustancias enumeradas en el cuadro 1) y con diversos testigos negativos (utilizando diferentes disolventes o vehículos). Las respuestas obtenidas con estos testigos positivos y negativos deben ser coherentes con la bibliografía. Esto no es aplicable a los laboratorios que tienen experiencia, esto es, que disponen de una base de datos históricos, según se define en los puntos 30 a 33.

29. Debe investigarse una selección de sustancias testigo positivo (véase el cuadro 1 del punto 25) en ausencia y en presencia de activación metabólica, para demostrar su capacidad de detectar productos mutágenos, para determinar la efectividad del sistema de activación metabólica y para demostrar la adecuación de las condiciones de crecimiento celular durante el tratamiento, la expresión fenotípica y la selección de mutantes, así como la adecuación de los procedimientos de examen. La gama de concentraciones de las sustancias seleccionadas debe elegirse de forma que produzcan aumentos sobre el nivel de fondo relacionados con la concentración y reproducibles, para demostrar la sensibilidad y el intervalo dinámico del sistema de ensayo.

**Datos sobre testigos históricos**

30. El laboratorio debe determinar:

— un intervalo y una distribución de los testigos positivos históricos,

— un intervalo y una distribución de los testigos negativos (sin tratar, disolventes) históricos.

31. Cuando se obtengan datos por primera vez en relación con una distribución de testigos negativos históricos, los testigos negativos en paralelo deben ser coherentes con los datos publicados de los testigos (22). Según se añadan más datos experimentales sobre la distribución de los testigos, los testigos negativos en paralelo deben situarse idealmente dentro de los límites de control del 95 % de dicha distribución (17) (45) (46).

32. La base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio debe constituirse en un principio con un mínimo de 10 experimentos, pero preferiblemente con al menos 20 experimentos realizados en condiciones experimentales comparables. Los laboratorios deben utilizar métodos de control de calidad, como gráficos de control [por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (47)], con el fin de determinar la variabilidad de sus datos sobre los testigos positivos y negativos, y de demostrar que la metodología está «controlada» en su laboratorio (46). En la bibliografía pueden encontrarse más recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (es decir, criterios de inclusión y exclusión de datos en los datos históricos y criterios de aceptabilidad para un determinado experimento) (45).

33. Los datos de los testigos negativos deben consistir en frecuencias de mutantes procedentes de cultivos únicos o preferiblemente replicados, tal como se describe en el punto 23. Lo ideal sería que los testigos negativos en paralelo estuvieran dentro de los límites de control del 95 % de la distribución de la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio (17) (45) (46). Cuando hay datos de los testigos negativos en paralelo que quedan fuera del límite de control del 95 %, su inclusión en la distribución de testigos históricos puede ser aceptable en la medida en que dichos datos no sean valores atípicos extremos y haya pruebas de que el sistema de ensayo está «controlado» (véase más arriba) y pruebas de la ausencia de fallos técnicos o humanos.

▼M8

34. Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de su coherencia con las bases de datos de testigos históricos existentes del laboratorio. Cualquier incoherencia importante debería dar lugar a la creación de una nueva base de datos de testigos históricos.

DATOS E INFORME

**Presentación de los resultados**

35. La presentación de los resultados debe incluir todos los datos necesarios para calcular la citotoxicidad (expresada como supervivencia relativa). Los datos, tanto los relativos a los cultivos tratados como a los testigos, deben incluir el número de células al final del tratamiento, el número de células sembradas inmediatamente después del tratamiento y los recuentos de colonias (o el número de pocillos sin colonias en el método de micropocillos). La supervivencia relativa de cada cultivo debe expresarse como porcentaje en relación con el control del disolvente en paralelo (véanse las definiciones del apéndice 1).

36. La presentación de los resultados debe incluir también todos los datos necesarios para calcular la frecuencia de mutantes. Los datos, tanto de los cultivos tratados como de los cultivos testigo, deben incluir: 1) el número de células sembradas con y sin agente selectivo (en el momento en que las células se siembran para la selección de mutantes), y 2) el número de colonias contadas (o el número de pocillos sin colonias en el método de micropocillos) en las placas con y sin agente selectivo. La frecuencia de mutantes se calcula a partir del número de colonias mutantes (en las placas con agente selectivo) corregido según la eficiencia de clonación (de las placas sin agente selectivo). La frecuencia de mutantes debe expresarse como número de células mutantes por millón de células viables (véanse las definiciones del apéndice 1).

37. Deben proporcionarse datos de cada cultivo. Además, se resumirán todos los datos en forma de cuadro.

**Criterios de aceptabilidad**

38. La aceptabilidad de un ensayo se basa en los criterios siguientes:

— El testigo negativo en paralelo se considera aceptable para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio de acuerdo con lo descrito en el punto 33.

— Los testigos positivos en paralelo (véase el punto 24) deben inducir respuestas compatibles con las obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo.

— Se someten a ensayo dos condiciones experimentales (es decir, con y sin activación metabólica), salvo cuando ya en una se produce un resultado positivo (véase el punto 25).

— Son analizables números y concentraciones apropiados de células (puntos 25, 26 y 19).

— Los criterios de selección de la concentración superior son coherentes con los descritos en los puntos 20, 21 y 22.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

39. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si, en alguna de las condiciones experimentales examinadas:

▼M8

— al menos una de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

— el aumento está relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

— alguno de estos resultados está fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límite de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 33).

Cuando se cumplen todos estos criterios, el producto problema se considera capaz de inducir mutaciones génicas en las células de mamífero cultivadas en este sistema de ensayo. En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (46) (48).

40. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas, también se cumple lo siguiente:

— ninguna de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

— no hay ningún aumento relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

— todos los resultados están dentro de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límite de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 33).

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir mutaciones génicas en las células de mamífero cultivadas en este sistema de ensayo.

41. No se requiere ninguna verificación de una respuesta claramente positiva o negativa.

42. En los casos en que la respuesta no sea ni claramente positiva ni claramente negativa como se describe más arriba, o a fin de ayudar a determinar la relevancia biológica de un resultado, los datos deben ser evaluados por expertos o mediante más investigaciones. Puede ser útil repetir un experimento, quizá con alguna modificación de las condiciones experimentales [por ejemplo, separación entre las concentraciones, otras condiciones de activación metabólica (es decir, concentración u origen de la fracción S9)].

43. En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos no permite que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo. Por lo tanto, debe concluirse que la respuesta del producto problema es dudosa (lo que se interpreta como que resulta igualmente probable que sea positiva o negativa).

**Informe del ensayo**

44. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

— estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

— medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

▼**M8**

Sustancias de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nomenclatura IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el párrafo anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Disolvente:*

— justificación de la elección del disolvente;

— porcentaje de disolvente en el medio de cultivo final.

*Células:*

En el caso de cultivos madre de laboratorio:

— tipo, fuente de las líneas celulares;

— número de pases, si se conoce, e historial en el laboratorio;

— características del cariotipo y/o número modal de los cromosomas;

— métodos de mantenimiento de los cultivos celulares;

— ausencia de micoplasmas;

— tiempos de duplicación de las células.

*Condiciones del ensayo:*

— fundamento de la selección de las concentraciones y del número de cultivos con inclusión, p. ej., de datos relativos a la citotoxicidad y límites de solubilidad;

— composición de los medios, concentración de $CO_2$, nivel de humedad;

— concentración del producto problema, expresada como concentración final en el medio de cultivo (por ejemplo, mM, o µg o mg/ml de medio de cultivo);

— concentración (o volumen) del disolvente y del producto problema añadidos al medio de cultivo;

— temperatura de incubación;

— tiempo de incubación;

— duración del tratamiento;

— densidad celular durante el tratamiento;

— tipo y composición del sistema de activación metabólica (origen de la fracción S9, método de preparación de la mezcla S9, concentración o volumen de mezcla S9 y de fracción S9 en el medio de cultivo final, controles de calidad de la fracción S9);

— sustancias testigo positivo y negativo, concentraciones finales en cada una de las condiciones de tratamiento;

▼**M8**

— duración del período de expresión (con el número de células sembradas, subcultivos y pautas de nutrición, si procede);

— identidad del agente selectivo y su concentración;

— criterios de aceptabilidad de los ensayos;

— métodos empleados para contar las células viables y las mutantes;

— métodos utilizados para medir la citotoxicidad;

— cualquier información adicional relativa a la citotoxicidad y método utilizado;

— duración de la incubación después de la siembra;

— criterios empleados para considerar si los estudios son positivos, negativos o dudosos;

— métodos utilizados para determinar el pH, la osmolalidad y la precipitación.

*Resultados:*

— número de células tratadas y número de células subcultivadas por cada cultivo;

— mediciones de la citotoxicidad y otras observaciones, en su caso;

— signos de precipitación y momento de la determinación;

— número de células sembradas en medio selectivo y no selectivo;

— número de colonias en medio no selectivo y número de colonias resistentes en medio selectivo, y frecuencias de mutantes correspondientes;

— relación concentración-respuesta, cuando sea posible;

— datos de los testigos negativos (disolvente) y positivos (concentraciones y disolventes) en paralelo;

— datos históricos de los testigos negativos (disolvente) y positivos, con intervalos, medias y desviaciones típicas e intervalo de confianza (p. ej., 95 %), así como número de datos;

— análisis estadísticos (correspondientes a los cultivos individuales y a las réplicas combinadas, en su caso), y valores p, en su caso.

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, París.

(2) Moore M.M., DeMarini D.M., DeSerres F.J. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, Nueva York.

▼**M8**

(3) Chu E.H.Y. and Malling H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306-1312.

(4) Moore M.M., Harrington-Brock K., Doerr C.L. and Dearfield K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagen. Res., 4, 394-403.

(5) Aaron C.S. and Stankowski Jr. L.F. (1989). Comparison of the AS52/ XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res.,223, 121-128.

(6) Aaron C.S., Bolcsfoldi G., Glatt H.R., Moore M., Nishi Y., Stankowski L., Theiss J. and Thompson E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res.,312, 235-239.

(7) Li A.P., Gupta R.S., Heflich R.H. and Wasson J. S. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-tox Program.Mutation Res., 196, 17-36.

(8) Scott D., Galloway S.M., Marshall R.R., Ishidate M., Brusick D., Ashby J. and Myhr B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A Report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147-204.

(9) Morita T., Nagaki T., Fukuda I. and Okumura K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268, 297-305.

(10) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion concentrations, Environ. Mutagen., 8, 789-886.

(11) Nesslany F., Simar-Meintieres S., Watzinger M., Talahari I. and Marzin D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutation Res., 49, 439-452.

(12) Long L.H., Kirkland D., Whitwell J. and Halliwell B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634, 177-183.

(13) Kirkland D., Aardema M., Henderson L., and Müller L. (2005). Evaluation of the Ability of a Battery of Three *In Vitro* Genotoxicity Tests to Discriminate Rodent Carcinogens and Non-Carcinogens. I: Sensitivity, Specificity and Relative Predictivity. Mutation Res., 5841-256.

(14) Li A.P., Carver J.H., Choy W.N., Hsie A.W., Gupta R.S., Loveday K.S., O'Neill J.P., Riddle J.C., Stankowski L.F. Jr. and Yang L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135-141.

(15) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9-17.

(16) Stankowski L.F. Jr., Tindall K.R. and Hsie A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulfonate- and ICR 191-Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133-147.

▼**M8**

(17) Arlett C.F., Smith D.M., Clarke G.M., Green M.H.L., Cole J., McGregor D.B. and Asquith J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Eds.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(18) Hsie A.W., Casciano D.A., Couch D.B., Krahn D.F., O'Neill J.P., and Whitfield B.L. (1981). The Use of Chinese Hamster Ovary Cells to Quantify Specific Locus Mutation and to Determine Mutagenicity of Chemicals; a Report of the Gene-Tox Program, Mutation Res., 86, 193-214.

(19) Li A.P. (1981). Simplification of the CHO/HGPRT Mutation Assay Through the Growth of Chinese Hamster Ovary Cells as Unattached Cultures, Mutation Res., 85, 165-175.

(20) Tindall K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff R., and Hsie A.W. (1984). Detection of Deletion Mutations in pSV2*gpt*-Transformed Cells, Mol. Cell. Biol., 4, 1411-1415.

(21) Hsie A. W., Recio L., Katz D. S., Lee C. Q., Wagner M., and Schenley R. L. (1986). Evidence for Reactive Oxygen Species Inducing Mutations in Mammalian Cells. Proc Natl Acad Sci., 83(24): 9616–9620.

(22) Lorge E., Moore M., Clements J., Donovan M. O., Honma M., Kohara A., Van Benthem J., Galloway S., Armstrong M.J., Thybaud V., Gollapudi B., Aardema M., Kim J., Sutter A., Kirkland D.J. (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(23) Coecke S., Balls M., Bowe G., Davis J., Gstraunthaler G., Hartung T., Hay R., Merten O.W., Price A., Schechtman L., Stacey G. and Stokes W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, ATLA, 33, 261-287.

(24) Rosen M.P., San R.H.C. and Stich H.F. (1980). Mutagenic Activity of Ascorbate in Mammalian Cell Cultures, Can. Lett. 8, 299-305.

(25) Natarajan A.T., Tates A.D, Van Buul P.P.W., Meijers M. and de Vogel N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37, 83-90.

(26) Abbondandolo A., Bonatti S., Corti G., Fiorio R., Loprieno N. and Mazzaccaro A. (1977). Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365-373.

(27) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347-364.

(28) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173, 215.

(29) Elliott B.M., Combes R.D., Elcombe C.R., Gatehouse D.G., Gibson G.G., Mackay J.M. and Wolf R.C. (1992) Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen. 7, 175-177.

(30) Matsushima T., Sawamura M., Hara K. and Sugimura T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres F.J., Fouts J.R., Bend J.R. and Philpot R.M. (Eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(31) Ong T.-m., Mukhtar M., Wolf C.R. and Zeiger E. (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. Pathol. *Toxicol*., 4, 55-65.

(32) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28, 51-59.

(33) PNUMA (2001). Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Disponible en: [http://www.pops.int.html].

(34) Tan E.-L. and Hsie A.W. (1981). Effect of Calcium Phosphate and Alumina Cγ Gels on the Mutagenicity and Cytotoxicity of Dimethylnitrosamine as Studied in the CHO/HGPRT System. Mutation Res., 84, 147-156.

(35) O'Neill J.P., Machanoff R., San Sebastian J.R., Hsie A.W. (1982). Cytotoxicity and Mutagenicity of Dimethylnitrosamine in Cammalian Cells (CHO/HGPRT system): Enhancement by Calcium Phosphate. Microbiol. Mol. Mutation., 4, 7-18.

(36) Li, A.P. (1984). Use of Aroclor 1254-Induced Rat Liver Homogenate in the Assaying of Promutagens in Chinese Hamster Ovary Cells. Microbiol. Mol. Mutation, 4, 7-18.

(37) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds.) Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91-103.

(38) Zamora P.O., Benson J.M., Li A.P. and Brooks A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen.,5, 795-801.

(39) OCDE (2014). Document Supporting the WNT Decision to Implement Revised Criteria for the Selection of the Top Concentration in the *In Vitro* Mammalian Cell Assays on Genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). Available upon request from the Organisation for Economic Cooperation and Development.

(40) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay, Environ. Mol. Mutation, 54, 36-43.

(41) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention. (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances,

(42) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. Available at: [https://federalregister.gov/a/2012-13774].

(43) O'Neill J.P. and Hsie A.W. (1979). Phenotypic Expression Time of Mutagen-Induced 6-thioguranine resistance in Chinese hamster ovary cells (CHO/HGPRT system), Mutation, Res., 59, 109-118.

(44) Chiewchanwit T., Ma H., El Zein R., Hallberg L., and Au W.W. (1995). Induction of Deletion Mutations by Methoxyacetaldehyde in Chinese Hamster Ovary (CHO)-AS52 cells. Mutation, Res., 1335(2):121-8.

▼**M8**

(45) Hayashi M., Dearfield K., Kasper P., Lovell D., Martus H.J., and Thybaud V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation,Res., 723, 87-90.

(46) OCDE (2014). Statistical Analysis Supporting the Revision of the Genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety, Series on testing and assessment (No 199), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(47) Richardson C., Williams D.A., Allen J.A., Amphlett G., Chanter D.O., and Phillips B. (1989). Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays. In: Slatistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D.J., (Ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(48) Fleiss J. L., Levin B., and Paik M. C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

Mutágenos por sustitución de pares de bases: Productos que provocan la sustitución de pares de bases en el ADN.

Producto: Sustancia o mezcla.

Eficiencia de clonación: Porcentaje de células sembradas a baja densidad que pueden crecer para formar una colonia que puede contarse.

Concentraciones: Concentraciones finales del producto problema en el medio de cultivo.

Citotoxicidad: En relación con los ensayos incluidos en este método de ensayo, la citotoxicidad se identifica como una reducción en la supervivencia relativa de las células tratadas en comparación con el testigo negativo (véase el punto específico).

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

Mutágenos por desplazamiento del marco de lectura: Productos que provocan la adición o supresión de uno o varios pares de bases en la molécula de ADN.

Genotoxicidad: Término general que engloba todos los tipos de lesión del ADN o del cromosoma, con inclusión de roturas de ADN, aductos, reorganizaciones, mutaciones, aberraciones cromosómicas y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en lesiones cromosómicas estables.

Medio HAT: Medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina, utilizado para la limpieza de mutantes Hprt.

Recombinación mitótica: Durante la mitosis, recombinación entre cromátidas homólogas que puede dar lugar a la inducción de roturas de la doble cadena de ADN, o a una pérdida de heterocigosis.

Medio MPA: Medio que contiene xantina, adenina, tiamidina, aminopterina y ácido micofenólico, utilizado para la limpieza de mutantes Xprt.

Mutágeno: Agente que provoca un cambio hereditario en una o varias secuencias de pares de bases del ADN en los genes o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).

Frecuencia de mutantes: Número de colonias mutantes dividido por el número de células sembradas en medio selectivo, corregido para tener en cuenta la eficiencia de clonación (o viabilidad) en el momento de la selección.

Período de expresión fenotípica: Tiempo después del tratamiento en el que la alteración genética se fija en el genoma y los eventuales productos génicos preexistentes se agotan hasta que se modifica el rasgo fenotípico.

Supervivencia relativa: Se utiliza como medida de la citotoxicidad relacionada con el tratamiento. La supervivencia relativa es la eficiencia de clonación de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta la eventual pérdida de células durante el tratamiento en comparación con la eficiencia de clonación en los testigos negativos (a los que se asigna una supervivencia del 100 %).

Fracciones hepáticas S9: Sobrenadante de homogeneizado de hígado después de centrifugación a 9000 g, es decir, extracto de hígado crudo.

▼**M8**

Mezcla S9: Mezcla de la fracción hepática S9 y de cofactores necesarios para la actividad metabólica de las enzimas.

Control del disolvente: Término general para definir los cultivos testigo que reciben solo el disolvente utilizado para disolver el producto problema.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

Testigo sin tratar: Cultivo que no recibe tratamiento (es decir, ni producto problema ni disolvente), pero que se somete en paralelo al mismo proceso que los cultivos que reciben el producto problema.

UVCB: Sustancias químicas de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

▼M8

*Apéndice 2*

FÓRMULAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y LA FRECUENCIA DE MUTANTES

La citotoxicidad se evalúa mediante la supervivencia relativa (SR), es decir, la eficiencia de clonación (EC) de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta la eventual pérdida de células durante el tratamiento en comparación con la eficiencia de clonación ajustada en los testigos negativos (a los que se asigna una supervivencia del 100 %) (véase más abajo la fórmula de la SR).

La EC ajustada correspondiente a un cultivo tratado con un producto problema se calcula de la siguiente manera:

$$\text{EC ajustada} = \frac{\text{Número de células al final del tratamiento}}{\text{Número de células al inicio del tratamiento}}$$

La SR correspondiente a un cultivo tratado con un producto problema se calcula de la siguiente manera:

$$\text{SR} = \frac{\text{EC ajustada en el cultivo tratado}}{\text{EC ajustada en el control del disolvente}} \times 100$$

La frecuencia de mutantes es la eficiencia de clonación de las colonias mutantes en el medio selectivo dividida por la eficiencia de clonación en el medio no selectivo en relación con el mismo cultivo en el momento de la selección.

$$\text{Frecuencia de mutantes} = \frac{\text{Eficiencia de clonación de colonias mutantes en medio selectivo}}{\text{Eficiencia de clonación en medio no selectivo}}$$

Cuando se utilizan placas para determinar la eficiencia de clonación:

EC = Número de colonias / Número de células sembradas.

Cuando se utilizan placas de micropocillos para determinar la eficiencia de clonación:

El número de colonias por pocillo en las placas de micropocillos sigue una distribución de Poisson.

Eficiencia de clonación = -Ln P(0) / Número de células sembradas por pocillo

donde -Ln P(0) es el número probable de pocillos vacíos de entre los pocillos sembrados y se describe mediante la fórmula siguiente:

Ln P(0) = -Ln (número de pocillos vacíos / número de pocillos sembrados).

▼M7

———————

———————

———————

▼B

## B.21. ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

#### 1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Es posible utilizar sistemas de cultivo de células de mamífero para descubrir modificaciones fenotípicas *in vitro* inducidas por sustancias químicas asociadas con transformación maligna *in vivo*. Entre las células de uso más frecuente figuran C3H10$T_{1/2}$, 3T3, SHE, rata Fisher; las pruebas se basan en modificaciones de la morfología celular, la formación de focos o modificaciones vinculadas con el crecimiento o no en agar semisólido. Existen sistemas, empleados con menor frecuencia, que ponen de manifiesto otras alteraciones fisiológicas o morfológicas en las células tras exposición a sustancias químicas carcinogénicas. Ninguno de los criterios analizados en estas pruebas *in vitro* tiene una relación de mecanismo establecida con el cáncer. Algunos de los sistemas de prueba son capaces de descubrir promotores tumorales. Puede determinarse la citotoxicidad averiguando el efecto de la sustancia estudiada sobre la capacidad de formación de colonias (eficacia de clonado) o los índices de crecimiento de los cultivos. La determinación de la citotoxicidad tiene por objeto establecer si la exposición a la sustancia analizada ha sido toxicológicamente significativa, pero no permite calcular la frecuencia de transformaciones en todas las pruebas, dado que en algunas de estas pueden ser necesarias una incubación prolongada, una nueva siembra o ambas.

#### 1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

#### 1.6. DESCRIPCION DEL MÉTODO

*Preparativos*

Células

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

Medio

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

▼B

Sustancia objeto de estudio

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

Actividad metabólica

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

*Condiciones del ensayo*

Uso de controles negativos y positivos

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

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

— Compuestos de acción directa:

  — etilmentanosulfonato

  — β-propiolactona

— Compuestos que precisan activación metabólica:

  — 2-acetilaminofluoreno

  — 4-dimetilaminoazobenceno

  — 7,12-dimetilbenzantraceno

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

Concentraciones de exposición

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

▼B

*Procedimiento*

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

2. **RESULTADOS**

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

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— tipo de célula utilizado, número de cultivos celulares, métodos de mantenimiento de los cultivos celulares,

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

— método utilizado para contar las células viables y transformadas,

— evaluación estadística,

— discusión de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼M8

B.22 **ENSAYO DE LETALIDAD DOMINANTE EN ROEDORES**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 478 de la OCDE (2016). Los métodos de ensayo se revisan periódicamente a la luz del progreso científico, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones relativas al bienestar animal. Esta versión modificada del método de ensayo refleja más de treinta años de experiencia con este ensayo y la posibilidad de integrarlo o combinarlo con otros ensayos de toxicidad, tales como estudios de desarrollo, toxicidad para la reproducción o genotoxicidad; sin embargo, debido a sus limitaciones y al uso de un gran número de animales, este ensayo no se destina a utilizarse como método primario, sino más bien como método de ensayo complementario que solo puede utilizarse cuando no existen alternativas para cumplir los requisitos normativos. La combinación de ensayos de toxicidad ofrece la posibilidad de no tener que utilizar un gran número de animales en tales ensayos. La OCDE ha elaborado un documento que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a las directrices de ensayo de la OCDE sobre toxicidad genética (1).

2. El objetivo del ensayo de letalidad dominante (LD) es investigar si los productos provocan mutaciones derivadas de aberraciones cromosómicas en células germinales. Además, el ensayo de letalidad dominante es pertinente para evaluar la genotoxicidad porque, aunque pueden variar entre las especies, los factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN están activos y contribuyen a la respuesta. La inducción de una mutación LD después de la exposición a un producto problema indica que este ha afectado al tejido germinal del animal de ensayo.

3. Las mutaciones LD provocan la muerte del embrión o del feto. La inducción de mutaciones LD tras la exposición a un producto problema indica que este ha afectado a las células germinales del animal de ensayo.

4. Un ensayo LD es útil para confirmar los resultados positivos de los ensayos utilizando criterios de valoración somáticos *in vivo*, y constituye un criterio pertinente para la predicción del peligro para el hombre y del riesgo de enfermedades genéticas transmitidas a través de la estirpe germinal. Sin embargo, este ensayo requiere un gran número de animales y mucho trabajo; como consecuencia de ello, su realización es muy cara y lenta. Puesto que la frecuencia espontánea de mutaciones letales dominantes es bastante elevada, es generalmente limitada la sensibilidad del ensayo para la detección de pequeños aumentos en la frecuencia de mutaciones.

5. Las definiciones de los términos clave figuran en el apéndice 1.

CONSIDERACIONES INICIALES

6. La prueba se lleva a cabo con mayor frecuencia con ratones (2) (3) (4), pero en algunos casos puede ser adecuado realizarla con otras especies, como las ratas (5) (6) (7) (8), si está científicamente justificado. En términos generales, las mutaciones LD consisten en grandes aberraciones cromosómicas (anomalías estructurales y numéricas) (9) (10) (11), pero no pueden excluirse las

▼M8

mutaciones génicas. Una mutación LD es una mutación que se produce en una célula germinal de por sí, o se fija en el embrión incipiente después de la fertilización, que no provoca disfunciones en el gameto, pero que es letal para el óvulo fecundado o el embrión en desarrollo.

7. Los distintos machos se aparean secuencialmente con hembras vírgenes a intervalos apropiados. El número de apareamientos después del tratamiento depende del propósito final del estudio LD (punto 23) y debe garantizar que se evalúen en cuanto a las mutaciones LD todas las fases de maduración de las células germinales de los machos (12).

8. No procede utilizar este ensayo si hay pruebas de que el producto problema, o sus metabolitos, no llegan a los testículos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

9. Generalmente, los machos se exponen a un producto problema por una vía de exposición adecuada y se aparean con hembras vírgenes no tratadas. Pueden someterse a ensayo diferentes tipos de células germinales mediante la utilización de intervalos de apareamiento secuenciales. Tras el apareamiento, las hembras se sacrifican al cabo de un período de tiempo adecuado, y se examinan sus úteros para determinar el número de implantes y de embriones vivos y muertos. La letalidad dominante de un producto problema se determina comparando el número de implantes vivos por hembra del grupo tratado con el número de implantes vivos por hembra del grupo de control del vehículo/disolvente. El aumento del número de implantes muertos por hembra del grupo tratado respecto al número de implantes muertos por hembra del grupo testigo refleja las pérdidas tras la implantación inducidas por el producto problema. Las pérdidas tras la implantación se calculan comparando la relación entre implantes muertos e implantes totales en el grupo tratado, con la relación entre implantes muertos e implantes totales en el grupo testigo. Las pérdidas previas a la implantación pueden calcularse comparando el número de cuerpos lúteos menos el de implantes totales o el número de implantes totales por hembra en los grupos tratado y testigo.

VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO

10. La competencia en este ensayo debe establecerse demostrando la capacidad de reproducir las frecuencias de mutaciones letales dominantes obtenidas de datos publicados [p. ej., (13) (14) (15) (16) (17) (18)] con sustancias testigo positivo (incluidas respuestas débiles) como las que figuran en el cuadro 1, y con controles de vehículo, y obteniendo con los testigos negativos unas frecuencias concordantes con un intervalo aceptable de datos (véanse las referencias anteriores) o con la distribución histórica de testigos del laboratorio, si se dispone de ella.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparaciones**

*Selección de la especie animal*

11. Deben emplearse animales sexualmente maduros, sanos, de cepas de laboratorio de uso corriente. Se utilizan habitualmente ratones, pero también puede ser adecuado recurrir a las ratas. Puede utilizarse cualquier otra especie apropiada de mamíferos, si se facilita la justificación científica en el informe.

▼M8

*Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales*

12. En el caso de los roedores, la temperatura en el local de los animales debe ser de 22 °C (± 3 °C). La humedad relativa debe ser idealmente del 50-60 %, como mínimo del 40 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente del producto problema si se administra por esta vía. Antes de proceder al tratamiento o al apareamiento, hay que alojar a los roedores en pequeños grupos (no más de cinco animales) del mismo sexo si no se esperan ni se observan comportamientos agresivos, preferiblemente en jaulas sólidas con un enriquecimiento ambiental adecuado. Los animales pueden alojarse individualmente si está científicamente justificado.

*Preparación de los animales*

13. Los animales adultos, sanos y sexualmente maduros, tanto machos como hembras, se reparten al azar entre los grupos tratado y testigo. Los animales se identifican individualmente utilizando un método compasivo y mínimamente invasivo (por ejemplo, mediante anillamiento, marcado, implantación de un microchip o identificación biométrica, pero no grapado a las orejas o los dedos), y se deja que se acostumbren a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se deben disponer de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Debe evitarse la contaminación cruzada con el testigo positivo y el producto problema. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder del ± 20 % del peso medio de cada sexo.

*Preparación de las dosis*

14. Los productos problema sólidos deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados, o mezclarse con la dieta o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Los productos problema líquidos pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En caso de exposición por inhalación, los productos problema pueden administrarse en forma de gas, vapor o aerosol sólido/líquido, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. Deben utilizarse preparaciones recientes del producto problema, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación y definan las condiciones adecuadas de esta.

**Condiciones de ensayo**

*Disolvente o vehículo*

15. El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a los volúmenes de dosis empleados, y no ha de sospecharse que reaccione químicamente con el producto problema. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Pueden citarse como ejemplos comúnmente utilizados de disolventes o vehículos compatibles el agua, el suero fisiológico, la solución de metilcelulosa, la solución de sal sódica de carboximetilcelulosa, el aceite de oliva y el aceite de maíz.

*Testigos positivos*

16. Deben utilizarse siempre animales testigo positivo en paralelo, a menos que el laboratorio haya demostrado su competencia en la realización del ensayo y haya utilizado el ensayo de forma sistemática en los últimos años (por ejemplo, en los últimos 5 años). Sin embargo, no es necesario tratar a los animales testigo positivo por la misma vía que a los animales que reciben el producto problema, ni tomar muestras a todos los intervalos de apareamiento. De las sustancias testigo positivo debe saberse que producen letalidad dominante en las condiciones utilizadas en el ensayo. Excepto en lo relativo

▼M8

al tratamiento, los animales de los grupos testigo deben someterse al mismo procedimiento que los de los grupos tratados.

17. Las dosis de las sustancias testigo positivo deben seleccionarse de manera que se produzcan efectos débiles o moderados que sirvan para evaluar críticamente el comportamiento y la sensibilidad del ensayo, pero también de manera que se produzcan sistemáticamente efectos positivos de mortalidad dominante. En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de sustancias testigo positivo y dosis apropiadas.

*Cuadro 1*

**Ejemplos de sustancias testigo positivo**

| Sustancia [n.º CAS] (n.º de referencia) | Intervalo efectivo de dosis (mg/kg) (especie de roedores) | Tiempo de administración (días) |
|---|---|---|
| Trietilenomelamina [51-18-3] (15) | 0,25 (ratones) | 1 |
| Ciclofosfamida [50-18-0] (19) | 50-150 (ratones) | 5 |
| Ciclofosfamida [50-18-0] (5) | 25-100 (ratas) | 1 |
| Metanosulfonato de etilo [62-50-0] (13) | 100-300 (ratones) | 5 |
| Acrilamida monomérica [79-06-1] (17) | 50 (ratones) | 5 |
| Clorambucilo [305-03-3] (14) | 25 (ratones) | 1 |

*Testigos negativos*

18. Respecto a cada tiempo de muestreo deben incluirse animales testigo negativo, tratados únicamente con el disolvente o vehículo, y sometidos en lo demás a lo mismo que los grupos de tratamiento (20). Si no se tienen datos de testigos, históricos o publicados, que indiquen que el disolvente/vehículo elegido no induce ninguna mutación letal dominante ni otros efectos nocivos, deben incluirse también para cada momento de muestreo animales testigo sin tratar, a fin de establecer que es aceptable el control del vehículo.

PROCEDIMIENTO

**Número de animales**

19. Cada macho se aparea secuencialmente a intervalos adecuados predeterminados (por ejemplo, intervalos semanales, puntos 21 y 23) de preferencia con una sola hembra virgen. El número de machos por grupo debe establecerse de antemano para que sea suficiente (en combinación con el número de hembras apareadas a cada intervalo de apareamiento) a fin de proporcionar la potencia estadística necesaria para detectar al menos una duplicación de la frecuencia de mutaciones LD (punto 44).

20. El número de hembras por intervalo de apareamiento también debe predeterminarse mediante cálculos de la potencia estadística para permitir la detección de al menos una duplicación en la frecuencia de mutaciones LD (es decir, una cantidad suficiente de hembras gestantes para proporcionar al menos 400 implantes totales) (20) (21) (22) (23) y que se prevea al menos un implante muerto por unidad de análisis (es decir, grupo de apareamiento por dosis) (24).

▼M8

**Intervalos entre períodos de administración y apareamientos**

21. El número de intervalos de apareamiento tras el tratamiento se rige por el programa de tratamiento, y debe garantizar que todas las fases de maduración de las células germinales de los machos se evalúan en cuanto a la inducción de mutaciones LD (12) (25). En caso de un único tratamiento y hasta cinco administraciones diarias de dosis, debe haber 8 (con ratones) o 10 (con ratas) apareamientos efectuados a intervalos semanales tras el último tratamiento. En caso de administraciones de dosis múltiples, el número de intervalos de apareamiento puede reducirse proporcionalmente al aumento del tiempo del período de administración, pero manteniendo el objetivo de evaluar todas las fases de la espermatogénesis (p. ej., tras una exposición de 28 días, solo 4 apareamientos semanales son suficientes para evaluar todas las fases de la espermatogénesis en el ratón). Todos los programas de tratamiento y apareamiento deben justificarse científicamente.

22. Las hembras deben permanecer con los machos durante al menos un ciclo estral (p. ej., una semana cubre un ciclo estral tanto en ratones como en ratas). Las hembras que no se hayan apareado durante el intervalo de una semana pueden utilizarse para un intervalo de apareamiento posterior. Otra posibilidad es hasta que se haya producido el apareamiento, determinado por la presencia de esperma en la vagina o por la presencia de un tapón vaginal.

23. El régimen seguido de exposición y apareamiento depende del objetivo final del estudio de LD. Si se trata de determinar si un producto químico dado induce *per se* mutaciones LD, el método aceptado sería exponer toda una ronda de espermatogénesis (p. ej., 7 semanas en el ratón, 5-7 tratamientos por semana) y aparear una vez al final. Sin embargo, si se trata de identificar el tipo de células germinales sensibles a la inducción de mutaciones LD, es preferible una exposición única o de 5 días seguida de apareamiento semanal.

**Dosis**

24. Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación del intervalo de dosis porque no se dispone aún de datos adecuados para ayudar en la selección de las dosis, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y régimen de tratamiento que se vayan a utilizar en el estudio principal (26). El estudio debe tratar de determinar la dosis máxima tolerada (DMT), es decir, la dosis más alta que se tolera sin signos de toxicidad que limite el estudio, en relación con la duración del período de estudio (por ejemplo, comportamiento o reacciones anormales, reducción del peso corporal o citotoxicidad para el sistema hematopoyético), pero sin llegar a la muerte ni presentar signos de dolor, sufrimiento o angustia que requieran el sacrificio compasivo (27).

25. La DMT tampoco debe afectar negativamente al éxito del apareamiento (21).

26. Los productos que tienen actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (tales como las hormonas y los mitógenos) y los productos que presentan saturación de las propiedades toxicocinéticas pueden constituir excepciones de los criterios de establecimiento de las dosis y deben evaluarse caso por caso.

27. A fin de obtener información sobre la relación dosis-respuesta, los estudios completos deben incluir un grupo testigo negativo y un mínimo de tres dosis separadas por un factor que será en general de 2 y nunca superior a 4. Si el producto problema no produce toxicidad en un estudio de determinación del intervalo o según los datos disponibles, la dosis más alta para una administración única debe ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. No obstante, si el producto problema provoca toxicidad, la DMT debe ser la mayor dosis administrada y las dosis deben abarcar preferentemente el intervalo desde

▼M8

la dosis máxima hasta una dosis que provoque toxicidad escasa o nula. En el caso de productos no tóxicos, la dosis límite para un período de administración de 14 días o más es de 1 000 mg/kg de peso corporal/día y, si se trata de períodos de administración de menos de 14 días, la dosis límite será de 2 000 mg/kg peso corporal/día.

**Administración de las dosis**

28. A la hora de diseñar el ensayo, debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por lo tanto, en casos justificados pueden elegirse vías de exposición tales como los alimentos, el agua de bebida, la subcutánea, la intravenosa, la tópica, la inhalación, la oral forzada o la implantación. En cualquier caso, la vía debe elegirse de forma que se garantice una exposición adecuada del tejido o tejidos diana. Normalmente no se recomienda la inyección intraperitoneal, ya que no es una vía de exposición humana prevista, y debe utilizarse solo en casos que tengan justificación científica específica. Si el producto problema se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, en particular en caso de administración única, debe procurarse que el plazo entre el consumo de los alimentos o el agua y el apareamiento sea suficiente para permitir la detección de los efectos (véase el punto 31). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por vía oral forzada o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe superar normalmente 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a un máximo de 2 ml/100 g. Si se utilizan volúmenes superiores a estos (en caso de que lo permita la legislación sobre bienestar animal), debe justificarse. La variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración, para garantizar un volumen constante en relación con el peso corporal en todas las dosis.

**Observaciones**

29. Deben hacerse observaciones clínicas generales de los animales de ensayo y registrarse los signos clínicos al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período de mayor intensidad de los efectos previstos tras la administración. Al menos dos veces al día durante el periodo de administración, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Deben pesarse todos los animales al principio del estudio, y al menos una vez por semana durante los estudios de administración continuada, y en el momento del sacrificio. El consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. Si el producto problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie esta y al menos una vez por semana. Los animales que presenten signos de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse antes de que termine el período del ensayo (27).

**Recogida y preparación de los tejidos**

30. Las hembras son sacrificadas en la segunda mitad de la gestación, el día 13 de esta en el caso de los ratones y el día 14-15 en el caso de las ratas. Se examinan los úteros con respecto a los efectos letales dominantes para determinar el número de implantes, embriones vivos y muertos, y cuerpos amarillos.

31. Se exponen las trompas uterinas y los ovarios para efectuar el recuento de cuerpos amarillos, y los fetos se retiran, se cuentan y se pesan. Hay que tener cuidado en examinar los úteros en cuanto a la presencia de reabsorciones oscurecidas por fetos vivos y en asegurarse de que se tienen en cuenta todas las reabsorciones. Se registra la mortalidad fetal. Se registran también el número de hembras fecundadas con éxito y el número total de implantes, las pérdidas previas a la implantación y la mortalidad tras la implantación (incluidas las reabsorciones precoces y tardías). Además, los fetos visibles

▼M8

pueden conservarse en el fijador de Bouin durante al menos 2 semanas, y después someterse a examen para detectar las principales malformaciones externas (28), con el fin de proporcionar información adicional en cuanto a los efectos del agente problema sobre la reproducción y sobre el desarrollo.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

32. Los resultados se presentarán en forma de tablas en las que aparezcan el número de machos apareados, el de hembras gestantes y el de hembras no gestantes. Se facilitarán por separado los resultados de cada apareamiento, incluida la identidad de cada macho y hembra. Deben enumerarse respecto a cada hembra el intervalo de apareamiento, la dosis recibida por los machos tratados y el número de implantes vivos y de implantes muertos.

33. Las pérdidas tras la implantación se calculan determinando la relación entre los implantes muertos y los implantes totales del grupo tratado en comparación con la relación entre los implantes muertos y los implantes totales del grupo de control del vehículo/disolvente.

34. Las pérdidas previas a la implantación se calculan como la diferencia entre el número de cuerpos amarillos y el número de implantes, o como una reducción del número medio de implantes por hembra en comparación con los apareamientos testigo. Cuando se calculen las pérdidas previas a la implantación, deberán indicarse.

35. El factor de letalidad dominante se calcula de la siguiente manera: (muertes tras la implantación / implantes totales por hembra) × 100.

36. Deben indicarse los datos sobre toxicidad y signos clínicos (según el punto 29).

**Criterios de aceptabilidad**

37. Los siguientes criterios determinan la aceptabilidad de un ensayo:

— El testigo negativo en paralelo es coherente con los niveles publicados de los datos históricos de los testigos negativos, y con los datos de testigos históricos del laboratorio, si estos están disponibles (véanse los puntos 10 y 18).

— Los testigos positivos en paralelo inducen respuestas coherentes con los niveles publicados de los datos históricos de los testigos positivos, o con la base de datos de testigos históricos positivos del laboratorio, si están disponibles, y producen un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo (véanse los puntos 17 y 18).

— Se han analizado números adecuados de implantes totales y dosis (punto 20).

— Los criterios para la selección de la dosis más elevada son coherentes con los descritos en los puntos 24 y 27.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

38. Deben analizarse al menos tres grupos tratados con el producto problema a fin de obtener datos suficientes para el análisis de la relación dosis-respuesta.

▼**M8**

39. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si:

— al menos una de las dosis de ensayo produce un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo;

— el aumento está relacionado con la dosis en al menos una condición experimental (p. ej., un intervalo de apareamiento semanal) cuando se evalúa con un ensayo adecuado; y

— alguno de los resultados está fuera del intervalo aceptable de los datos de los testigos negativos, o de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (p. ej., límite del control del 95 % según la distribución de Poisson), si están disponibles.

El producto problema se considera entonces capaz de inducir mutaciones letales dominantes en las células germinales de los animales de ensayo. Las recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados se describen en el punto 44; también pueden encontrarse en la bibliografía otros enfoques estadísticos recomendados (20) (21) (22) (24) (29). Las pruebas estadísticas utilizadas deben considerar como unidad experimental al animal.

40. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si:

— ninguna de las dosis de ensayo presenta un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo;

— no hay ningún aumento relacionado con la dosis en ninguna de las condiciones experimentales; y

— todos los resultados están dentro del intervalo aceptable de los datos de los testigos negativos, o de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (p. ej., límite del control del 95 % según la distribución de Poisson), si están disponibles.

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir mutaciones letales dominantes en las células germinales de los animales de ensayo.

41. No se requiere ninguna verificación de una respuesta claramente positiva o claramente negativa.

42. Si la respuesta no es claramente negativa o positiva, y para ayudar a determinar la pertinencia biológica de un resultado (p. ej., un incremento débil o dudoso), los datos deben ser evaluados por expertos o mediante otras investigaciones utilizando los datos experimentales existentes, como la consideración de si el resultado positivo se encuentra fuera del intervalo aceptable de datos de los testigos negativos o de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (30).

43. En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos puede no permitir que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo, por lo que se considerará dudoso.

44. Las pruebas estadísticas utilizadas deben considerar como unidad experimental al animal macho. Si bien es posible que los datos de recuento (p. ej., el número de implantes por hembra) se ajusten a una distribución de Poisson y/o las proporciones (p, ej., la proporción de implantes muertos) puedan tener una distribución binomial, es frecuente que estos datos estén sobredispersados (31). Por consiguiente, el análisis estadístico debe basarse en primer lugar en un ensayo de sobredispersión o de subdispersión utilizando pruebas de varianza como, por ejemplo, la prueba de varianza binomial de Cochran (32) o la prueba C(α) de Tarone de la sobredispersión binomial (31) (33). Si no se detecta desviación de la dispersión binomial, las tendencias en las proporciones entre las distintas dosis pueden comprobarse utilizando la prueba de tendencia de Cochran-Armitage (34) y las comparaciones de

▼M8

pares con el grupo testigo pueden probarse mediante la prueba exacta de Fisher (35). De la misma manera, si no se detecta desviación de la dispersión de Poisson, pueden comprobarse las tendencias en los recuentos utilizando la regresión de Poisson (36) y las comparaciones de pares con el grupo testigo pueden comprobarse en el contexto del modelo de Poisson, utilizando contrastes de pares (36). Si se detecta una sobredispersión o una subdispersión, se recomienda utilizar métodos no paramétricos (23) (31). Entre estos se incluyen pruebas basadas en la posición, como la prueba de Jonckheere-Terpstra sobre la tendencia (37) y las pruebas de Mann-Whitney (38), sobre comparaciones de pares con el grupo de control del vehículo/disolvente, así como pruebas de permutación, remuestreo o *bootstrap* sobre tendencias y comparaciones de pares con el grupo testigo (31) (39).

45. Un ensayo LD positivo aporta la prueba de la genotoxicidad del producto problema para las células germinales del macho tratado de la especie sometida a ensayo.

46. Para la evaluación de la significación biológica de la respuesta puede servir de orientación considerar si los valores observados se encuentran dentro o fuera del intervalo de los testigos históricos (40).

**Informe del ensayo**

47. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Resumen.*

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se conocen;

— estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

— medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancias de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Preparación del producto problema:*

— justificación de la elección del vehículo;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen;

▼**M8**

— preparación de formulaciones para la administración con los alimentos, con el agua de bebida o por inhalación;

— determinaciones analíticas de las formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, concentraciones nominales) si se realizan.

*Animales de ensayo:*

— especie y cepa utilizadas y justificación de la elección;

— número, edad y sexo de los animales;

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;

— método de identificación individual de los animales;

— en el caso de estudios a corto plazo: peso corporal individual de los machos al inicio y al final del ensayo; para estudios de duración superior a una semana: pesos corporales individuales durante el estudio y consumo de alimentos. Deben incluirse el intervalo, la media y la desviación típica de los pesos corporales de cada grupo.

*Condiciones del ensayo:*

— datos de los testigos positivos y negativos (vehículo o disolvente);

— datos del estudio de determinación del intervalo de dosis;

— justificación de la selección de las dosis;

— datos de la preparación del producto problema;

— datos sobre la administración del producto problema;

— justificación de la elección de la vía de administración;

— métodos de determinación de la toxicidad para los animales, incluidos los eventuales análisis histopatológicos o hematológicos, y frecuencia con que se han medido los pesos corporales y se han realizado las observaciones de los animales;

— métodos de comprobación de que el producto problema ha alcanzado el tejido diana, o la circulación general, si se obtienen resultados negativos;

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) calculadas a partir del consumo y de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida, en su caso;

— datos de la calidad de los alimentos y el agua;

— datos sobre el enriquecimiento ambiental de las jaulas;

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y muestreo y justificación de las decisiones;

— método de analgesia;

— método de sacrificio;

▼**M8**

— procedimientos de aislamiento y conservación de los tejidos;

— origen y números de lote de todos los juegos y reactivos (si procede);

— métodos para el recuento de las mutaciones LD;

— programa de apareamiento;

— métodos utilizados para determinar que ha tenido lugar el apareamiento;

— momento del sacrificio;

— criterios de examen de los efectos LD, incluidos los cuerpos lúteos, los implantes, las reabsorciones y las pérdidas previas a la implantación, los implantes vivos y los implantes muertos.

*Resultados:*

— estado de los animales antes del ensayo y a lo largo de este, incluidos los signos de toxicidad;

— peso corporal de los machos durante el tratamiento y los períodos de apareamiento;

— número de hembras apareadas;

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible;

— datos sobre los testigos negativos en paralelo e históricos, con intervalos, medias y desviaciones típicas;

— datos sobre los testigos positivos en paralelo;

— datos tabulados sobre cada madre, incluyendo: número de cuerpos amarillos por madre; número de implantes por madre; número de reabsorciones y pérdidas previas a la implantación por madre; número de implantes vivos por madre; número de implantes muertos por madre; peso de los fetos;

— los datos anteriores resumidos, respecto a cada período de apareamiento y dosis, con las frecuencias de mutaciones letales dominantes;

— análisis estadísticos y métodos aplicados.

*Discusión de los resultados.*

*Conclusión.*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OCDE, París.

(2) Bateman, A.J. (1977). The Dominant Lethal Assay in the Male Mouse, in Handbook of Mutagenicity Test Procedures B.J. Kilbey *et. al.* (Eds.) pp. 235-334, Elsevier, Amsterdam

(3) Ehling U.H., Ehling, U.H., Machemer, L., Buselmaier, E., Dycka, D., Frohberg, H., Kratochvilova, J., Lang, R., Lorke, D., Muller, D., Pheh, J., Rohrborn, G., Roll, R., Schulze-Schencking, M., and Wiemann, H. (1978). Standard Protocol for the Dominant Lethal Test on Male Mice. Set up by the Work Group «Dominant» lethal mutations of the ad hoc Committee Chemogenetics, Arch. *Toxicol., 39*, 173-185

▼**M8**

(4) Shelby M.D. (1996). Selecting Chemicals and Assays for Assessing Mammalian Germ Cell Mutagenicity. Mutation Res,. 352:159-167.

(5) Knudsen I., Knudsen, I., Hansen, E.V., Meyer, O.A. and Poulsen, E. (1977). A proposed Method for the Simultaneous Detection of Germ-Cell Mutations Leading to Fetal Death (Dominant Lethality) and of Malformations (Male Teratogenicity) in Mammals. Mutation Res., 48:267-270.

(6) Anderson D., Hughes, J.A., Edwards, A.J. and Brinkworth, M.H. (1998). A Comparison of Male-Mediated Effects in Rats and Mice Exposed to 1,3-Butadiene. Mutation Res., 397:77-74.

(7) Shively C.A., C.A., White, D.M., Blauch, J.L. and Tarka, S.M. Jr. (1984). Dominant Lethal Testing of Theobromine in Rats. *Toxicol.* Lett. 20:325-329.

(8) Rao K.S., Cobel-Geard, S.R., Young, J.T., Hanley, T.R. Jr., Hayes, W.C., John, J.A. and Miller, R.R. (1983). Ethyl Glycol Monomethyl Ether II. Reproductive and dominant Lethal Studies in Rats. Fundam. Appl. *Toxicol*., 3:80-85.

(9) Brewen J.G., Payne, H.S., Jones, K.P., and Preston, R.J. (1975). Studies on Chemically Induced Dominant Lethality. I. The Cytogenetic Basis of MMS-Induced Dominant Lethality in Post-Meiotic Male Germ Cells, Mutation Res., 33, 239-249.

(10) Marchetti F., Bishop, J.B., Cosentino, L., Moore II, D. and Wyrobek, A.J. (2004). Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations in Mouse Zygotes Determine their Embryonic Fate. Biol. Reprod., 70:616-624.

(11) Marchetti F. and Wyrobek, A.J. (2005). Mechanisms and Consequences of Paternally Transmitted Chromosomal Aberrations. Birth Defects Res., C 75:112-129.

(12) Adler I.D. (1996). Comparison of the Duration of Spermatogenesis Between Rodents and Humans. Mutation Res., 352:169-172.

(13) Favor J., and Crenshaw J.W. (1978). EMS-Induced Dominant Lethal Dose Response Curve in DBA/1J Male Mice, Mutation Res., 53: 21–27.

(14) Generoso W.M., Witt, K.L., Cain, K.T., Hughes, L. Cacheiro, N.L.A, Lockhart, A.M.C. and Shelby, M.D. (1995). Dominant Lethal and Heritable Translocation Test with Chlorambucil and Melphalan. Mutation Res., 345:167-180.

(15) Hastings S.E., Huffman K.W. and Gallo M.A. (1976). The dominant Lethal Effect of Dietary Triethylenemelamine, Mutation Res., 40:371-378.

(16) James D.A. and Smith D.M. (1982). Analysis of Results from a Collaborative Study of the Dominant Lethal Assay, Mutation Res., 99:303-314.

(17) Shelby M.D., Cain, K.T., Hughes, L.A., Braden, P.W. and Generoso, W.M. (1986). Dominant Lethal Effects of Acrylamide in Male Mice. Mutation Res., 173:35-40.

▼**M8**

(18) Sudman P.D., Rutledge, J.C., Bishop, J.B. and Generoso W.M. (1992). Bleomycin: Female-Specific Dominant Lethal Effects in Mice, Mutation Res., 296: 143-156.

(19) Holstrom L.M., Palmer A.K. and Favor, J. (1993). The Rodent Dominant Lethal Assay. In Supplementary Mutagenicity Tests. Kirkland D.J. and Fox M. (Eds.), Cambridge University Press, pp. 129-156.

(20) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417:19–30.

(21) Adler I.D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312:313-318.

(22) Generoso W.M. and Piegorsch W.W. (1993). Dominant Lethal Tests in Male and Female Mice. Methods, *Toxicol*., 3A:124-141.

(23) Haseman J.K. and Soares E.R. (1976).The Distribution of Fetal Death in Control Mice and its Implications on Statistical Tests for Dominant Lethal Effects. Mutation. Res., 41: 277-288.

(24) Whorton E.B. Jr. (1981). Parametric Statistical Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments. The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality, Teratogen. Carcinogen. *Mutagen*., 1:353 – 360.

(25) Anderson D., Anderson, D., Hodge, M.C.E., Palmer, S., and Purchase, I.F.H. (1981). Comparison of Dominant Lethal and Heritable Translocation Methodologies. Mutation. Res., 85:417-429.

(26) Fielder R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagen., 7:313-319.

(27) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 19), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(28) Barrow M.V., Taylor W.J and Morphol J. (1969). A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Fetuses, 127, 291–306.

(29) Kirkland D.J., (Ed.) (1989). Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Cambridge University Press.

(30) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper P., Lovell D., Martus H.-J. and Thybaud V. (2011). «Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data», Mutation. Res., 723:87-90.

(31) Lockhart A.C., Piegorsch W.W. and Bishop J.B. (1992). Assessing Over Dispersion and Dose-Response in the Male Dominant Lethal Assay. Mutation. Res., 272:35-58.

(32) Cochran W.G. (1954). Some Methods for Strengthening the Common $\chi^2$ Tests. Biometrics, 10: 417-451.

▼**M8**

(33) Tarone R.E. (1979). Testing the Goodness of Fit of the Binomial Distribution. *Biometrika*, 66: 585-590.

(34) Margolin B.H. (1988). Test for Trend in Proportions. In *Encyclopedia of* Statistical Sciences, Volume 9, Kotz S. and Johnson N. L. (Eds.), pp. 334-336. John Wiley and Sons, New York.

(35) Cox D.R., Analysis of Binary Data. Chapman and Hall, London (1970).

(36) Neter J.M., Kutner, H.C., Nachtsheim, J. and Wasserman, W. (1996). Applied Linear Statistical Models, Fourth Edition, Chapters 14 and 17. McGraw-Hill, Boston

(37) Jonckheere R. (1954). A Distribution-Free K-Sample Test Against Ordered Alternatives. *Biometrika,* 41:133-145.

(38) Conover W.J. (1971). Practical Nonparametric Statistics. John Wiley and Sons, New York

(39) Efron, B. (1982). The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA.

(40) Fleiss J. (1973). Statistical Methods for Rates and Proportions. John Wiley and Sons, Nueva York.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

Producto: Sustancia o mezcla.

Cuerpo lúteo: Estructura secretora de hormonas formada en el ovario en el lugar en que un folículo ha liberado un óvulo. El número de cuerpos lúteos en los ovarios corresponde al número de óvulos que se han desprendido.

Mutación letal dominante: Mutación que se produce en una célula germinal, o se fija tras la fertilización, que provoca la muerte del embrión o del feto.

Tasa de fertilidad: Número de hembras apareadas gestantes respecto al número total de hembras apareadas.

Intervalo de apareamiento: Tiempo transcurrido entre el final de la exposición y el apareamiento de los machos tratados. Mediante el control de este intervalo pueden evaluarse los efectos del producto sobre los diferentes tipos de células germinales. En los ratones, el apareamiento durante las semanas número 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 después de la finalización de las medidas de exposición afecta al esperma, espermátides condensadas, espermátides redondas, espermatocitos en paquiteno, espermatocitos en fase temprana, espermatogonios diferenciados, espermatogonios en fase de diferenciación, y espermatogonios de células precursoras.

Pérdidas previas a la implantación: Diferencia entre el número de implantes y el número de cuerpos amarillos. También puede estimarse comparando los implantes totales por hembra en los grupos tratado y testigo.

Pérdidas tras la implantación: Relación del número de implantes muertos en el grupo tratado comparada con la relación entre los implantes muertos y el total de implantes del grupo testigo.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

UVCB: Sustancias químicas de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

▼**M8**

*Apéndice 2*

CRONOLOGÍA DE LA ESPERMATOGÉNESIS EN LOS MAMÍFEROS

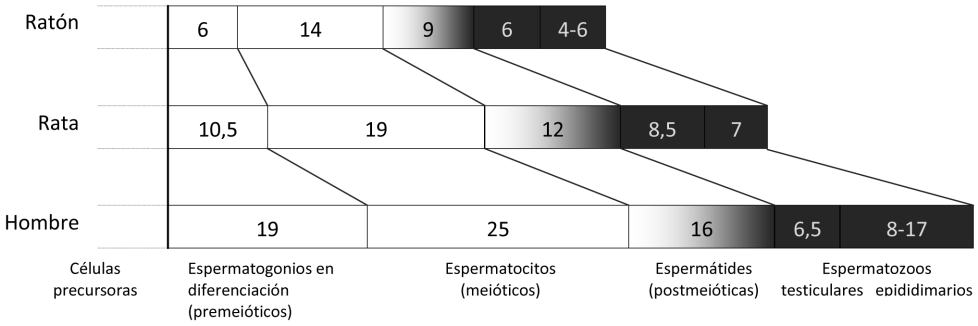



**Figura 1** Comparación de la duración (en días) de desarrollo de las células germinales masculinas en ratones, ratas y hombres. Durante los períodos indicados con sombreado no se produce reparación del ADN.

Arriba se muestra un esquema de la espermatogénesis en ratones, ratas y hombres (tomado de Adler, 1996). Entre los espermatogonios sin diferenciar se incluyen los espermatogonios de tipo A sencillos; de tipo A emparejados; y de tipo A alineados (Hess & de Franca, 2008). Los espermatogonios de tipo A sencillos se consideran como las verdaderas células precursoras; por tanto, para evaluar los efectos en las células precursoras, deben pasar al menos 49 días (en el ratón) entre la última inyección de la sustancia problema y el apareamiento.

***BIBLIOGRAFÍA***

Adler, ID (1996). Comparison of the duration of spermatogenesis between rodents and humans. Mutat Res, 352:169-172.

Hess, RA, De Franca LR (2008). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. En: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, C. Yan Cheng (Ed), Landes Biosciences and Springer Science&Business Media:1-15.

▼M8

## B.23 ENSAYO DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ESPERMATOGONIOS DE MAMÍFERO

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 483 de la OCDE (2016). Los métodos de ensayo se revisan periódicamente a la luz del progreso científico, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones relativas al bienestar animal. La presente versión modificada del método de ensayo refleja muchos años de experiencia con este ensayo y la posibilidad de integrar o combinar este ensayo con otros ensayos de toxicidad o genotoxicidad. La combinación de estudios de toxicidad tiene la posibilidad de reducir el número de animales utilizados en los ensayos de toxicidad. El presente método forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. La OCDE ha elaborado un documento que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a las directrices de ensayo de la OCDE sobre toxicidad genética (1).

2. El ensayo de aberraciones cromosómicas en espermatogonios de mamífero *in vivo* tiene por objeto detectar los productos que provocan aberraciones cromosómicas estructurales en espermatogonios de mamífero (2) (3) (4). Además, este ensayo es pertinente para evaluar la genotoxicidad porque, aunque pueden variar entre las especies, los factores del metabolismo *in vivo*, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN están activos y contribuyen a la respuesta. El presente método de ensayo no está diseñado para medir las anomalías numéricas; el ensayo no se utiliza normalmente con este objetivo.

3. Este ensayo mide las aberraciones cromosómicas estructurales (tanto de tipo cromosoma como de tipo cromátida) en los espermatogonios en fase de división, por lo que se espera que sirva para predecir la inducción de mutaciones hereditarias en estas células germinales.

4. Las definiciones de los términos clave figuran en el apéndice.

### CONSIDERACIONES INICIALES

5. En este ensayo se utilizan habitualmente roedores, pero en algunos casos pueden ser adecuadas otras especies, si está justificado científicamente. Las preparaciones citogenéticas normales de testículos de roedor generan metafases mitóticas (espermatogonios) y meióticas (espermatocitos). Las metafases mitóticas y meióticas se identifican sobre la base de la morfología de los cromosomas (4). Este ensayo citogenético *in vivo* detecta las aberraciones cromosómicas en las mitosis de los espermatogonios. El presente método de ensayo no se refiere a otras células diana.

6. Para detectar las aberraciones de tipo cromátida en espermatogonios, hay que examinar la primera división celular mitótica tras el tratamiento, antes de que estas aberraciones se conviertan en aberraciones de tipo cromosoma en las divisiones celulares posteriores. Puede obtenerse información adicional de los espermatocitos tratados, mediante análisis cromosómico meiótico, en relación con las aberraciones estructurales cromosómicas en diacinesia-metafase I y metafase II.

▼M8

7. Existen varias generaciones de espermatogonios presentes en el testículo (5), y estos distintos tipos de células germinales pueden tener todo un espectro de sensibilidad al tratamiento con el producto. Por lo tanto, las aberraciones detectadas representan una respuesta global de las poblaciones de espermatogonios tratados. La mayoría de las células mitóticas presentes en las preparaciones de los testículos son espermatogonios B, que tienen un ciclo celular de 26 horas aproximadamente (3).

8. No procede utilizar este ensayo si hay pruebas de que el producto problema, o sus metabolitos, no llegan a los testículos.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

9. En general, los animales se exponen al producto problema por una vía adecuada y se sacrifican de forma compasiva, en momentos adecuados después del tratamiento. Antes de sacrificarlos, se tratan con un agente que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, colchicina o Colcemid®). A continuación, se realizan preparaciones de cromosomas de células germinales y se tiñen, tras lo cual se analizan las células en metafase para detectar aberraciones cromosómicas.

VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO

10. La competencia en este ensayo debe establecerse demostrando la capacidad de reproducir los resultados previstos en cuanto a las frecuencias de las aberraciones cromosómicas estructurales en espermatogonios con sustancias testigo positivo (incluidas las respuestas débiles), como las que figuran en el cuadro 1, y obteniendo frecuencias con testigos negativos compatibles con un intervalo aceptable de datos de testigos en la bibliografía publicada [p. ej., (2) (3) (6) (7) (8) (9) (10)] o con la distribución histórica de testigos del laboratorio, si se dispone de ella.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparaciones**

*Selección de la especie animal*

11. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Se utilizan normalmente ratones macho; no obstante, pueden utilizarse machos de otras especies adecuadas de mamíferos cuando esté científicamente justificado y para permitir que este ensayo se lleve a cabo conjuntamente con otro método de ensayo. Debe facilitarse en el informe la justificación científica de la utilización de especies distintas de las de roedores.

*Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales*

12. En el caso de los roedores, la temperatura en el local de los animales debe ser de 22 °C (± 3 °C). La humedad relativa debe ser idealmente del 50-60 %, como mínimo del 40 % y preferentemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente del producto problema si se administra por esta vía. Hay que alojar a los roedores en grupos pequeños (no más de cinco animales por jaula) si no se esperan comportamientos agresivos, preferiblemente en jaulas de suelo continuo con un enriquecimiento ambiental adecuado. Los animales pueden alojarse individualmente si está científicamente justificado.

▼M8

*Preparación de los animales*

13. Se utilizan normalmente animales machos sanos, adultos jóvenes (8-12 semanas de edad al inicio del tratamiento) y se asignan aleatoriamente a los grupos testigo y de tratamiento. Los animales se identifican individualmente utilizando un método compasivo y mínimamente invasivo (por ejemplo, mediante anillamiento, marcado, implantación de un microchip o identificación biométrica, pero no grapado a las orejas o los dedos), y se deja que se acostumbren a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se deben disponer de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Debe evitarse la contaminación cruzada con el testigo positivo y el producto problema. Al empezar el estudio, la variación de peso entre los distintos animales ha de ser mínima y no debe exceder del ± 20 %.

*Preparación de las dosis*

14. Los productos problema sólidos deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados, o mezclarse con la dieta o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Los productos problema líquidos pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En caso de exposición por inhalación, los productos problema pueden administrarse en forma de gas, vapor o aerosol sólido/líquido, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. Deben utilizarse preparaciones recientes del producto problema, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación y definan las condiciones adecuadas de esta.

**Condiciones de ensayo — disolvente/vehículo**

15. El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a las dosis empleadas, y no debe ser capaz de reaccionar químicamente con los productos problema. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Pueden citarse como ejemplos comúnmente utilizados de disolventes o vehículos compatibles el agua, el suero fisiológico, la solución de metilcelulosa, la solución de sal sódica de carboximetilcelulosa, el aceite de oliva y el aceite de maíz. A falta de información histórica o publicada sobre testigos que demuestre que un disolvente o vehículo elegido atípico no induce ninguna aberración cromosómica estructural ni otro tipo de efectos nocivos, debe realizarse un estudio inicial a fin de establecer la aceptabilidad del control del disolvente/vehículo.

*Testigos positivos*

16. Deben utilizarse siempre animales testigo positivo en paralelo, a menos que el laboratorio haya demostrado su competencia en la realización del ensayo y haya utilizado este de forma sistemática en los últimos años (por ejemplo, en los últimos 5 años). Si no se incluye un grupo testigo positivo en paralelo, debe contarse en cada experimento con testigos de examen (portaobjetos fijados y sin teñir). Esto puede conseguirse incluyendo en el examen del estudio muestras de referencias adecuadas que se hayan obtenido y conservado a partir de un experimento con testigo positivo aparte realizado periódicamente (por ejemplo, cada 6 o 18 meses) en el laboratorio donde se realiza el ensayo; por ejemplo, durante las pruebas de competencia y, a continuación, con carácter periódico, en caso necesario.

17. Las sustancias utilizadas como testigo positivo deben provocar con fiabilidad un aumento detectable en las frecuencias de aparición de células con aberraciones cromosómicas estructurales respecto al nivel espontáneo. Las dosis del testigo positivo deben elegirse de tal forma que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al examinador la identidad de las muestras codificadas. En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de sustancias válidas como testigo positivo.

▼M8

*Cuadro 1*

**Ejemplos de sustancias testigo positivo**

| Sustancias [N.º CAS] (n.º de referencia) |
|---|
| Ciclofosfamida (monohidrato) [n.º CAS 50-18-0 (n.º CAS 6055-19-2)] (9) |
| Ciclohexilamina [n.º CAS 108-91-8] (7) |
| Mitomicina C [n.º CAS 50-07-7] (6) |
| Acrilamida monomérica [n.º CAS 79-06-1] (10) |
| Trietilenomelamina [n.º CAS 51-18-3] (8) |

*Testigos negativos*

18. Respecto a cada tiempo de muestreo deben incluirse animales testigo negativo, tratados únicamente con el disolvente o vehículo, y tratados en lo demás de la misma manera que los grupos de tratamiento. Si no se tienen datos de testigos, históricos o publicados, que indiquen que el disolvente/vehículo elegido no induce ninguna aberración cromosómica ni otros efectos nocivos, deben incluirse también respecto a cada momento de muestreo animales testigo sin tratar, a fin de establecer que es aceptable el control del vehículo.

PROCEDIMIENTO

**Número de animales**

19. Los tamaños de los grupos en el momento del inicio del estudio deben establecerse con el objetivo de proporcionar un mínimo de 5 machos por grupo. Se considera que este número de animales por grupo es suficiente para proporcionar una potencia estadística adecuada (es decir, que puede detectarse en general, como mínimo, una duplicación de la frecuencia de las aberraciones cromosómicas cuando el nivel del testigo negativo es igual o superior al 1,0 % con una probabilidad del 80 %, con un nivel de significación de 0,05) (3) (11). Como orientación sobre las necesidades máximas típicas de animales, un estudio con dos momentos de muestreo con tres grupos tratados y un grupo testigo negativo en paralelo, más un grupo testigo positivo (cada grupo compuesto por cinco animales), requeriría 45 animales.

**Pauta de tratamiento**

20. Los productos problema suelen administrarse una sola vez (es decir, como un único tratamiento); pueden utilizarse otras posologías, siempre que estén científicamente justificadas.

21. En el lote al que se ha administrado la dosis máxima se toman muestras en dos momentos tras el tratamiento. Dado que el tiempo necesario para que el producto o productos problema se absorban y se metabolicen, así como su efecto sobre la cinética del ciclo celular, pueden modificar el momento óptimo para detectar aberraciones cromosómicas, se recomienda un momento de muestreo temprano y otro tardío, a las 24 y 48 horas después del tratamiento. En relación con dosis distintas de la dosis más alta, debe hacerse un muestreo temprano a las 24 horas después del tratamiento (menos o igual que el tiempo del ciclo celular de los espermatogonios B, optimizando así la probabilidad de examinar las primeras metafases posteriores al tratamiento), a menos que se sepa que otro momento de muestreo es más adecuado y está justificado.

22. Pueden utilizarse otros momentos de muestreo. Por ejemplo, en el caso de productos que ejercen efectos independientes de la fase S, pueden ser adecuados momentos de muestreo anteriores (es decir, inferiores a 24 horas).

▼M8

23. Puede utilizarse una pauta de administración repetida, por ejemplo en conjunción con un ensayo sobre otro parámetro que utilice un período de administración de 28 días (p. ej., el método B.58); sin embargo, se necesitarían grupos adicionales de animales para aplicar los diferentes tiempos de muestreo. Por consiguiente, la idoneidad de dicha pauta debe justificarse científicamente caso por caso.

24. Antes de sacrificar los animales, se les inyecta por vía intraperitoneal una dosis adecuada de una sustancia que detenga la división celular en la metafase (por ejemplo, Colcemid® o colchicina). Se toman posteriormente muestras de los animales, a un intervalo adecuado. En el caso de los ratones y las ratas, este intervalo es de 3 a 5 horas aproximadamente.

**Dosis**

25. Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación del intervalo porque no se dispone antes de datos adecuados para ayudar en la selección de las dosis, dicho estudio ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y pauta de tratamiento que se vayan a utilizar en el estudio principal, según las recomendaciones para la realización de estudios de determinación del intervalo (12). Este estudio debe tratar de determinar la dosis máxima tolerada (DMT), definida como la dosis que induce efectos ligeramente tóxicos con respecto a la duración del período de estudio (por ejemplo, comportamiento o reacciones de tipo anormal, pequeña pérdida de peso corporal o citotoxicidad para el sistema hematopoyético), pero sin llegar a provocar la muerte ni signos de dolor, sufrimiento o angustia que hagan necesaria la eutanasia (13).

26. La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad en los espermatogonios (por ejemplo, disminución de la proporción entre el número de mitosis de los espermatogonios y el número de metafases meióticas primera y segunda); la disminución no ha de ser superior al 50 %.

27. Los productos que tienen actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (tales como las hormonas y los mitógenos) y los productos que presentan saturación de las propiedades toxicocinéticas pueden constituir excepciones de los criterios de establecimiento de las dosis y deben evaluarse caso por caso.

28. A fin de obtener información sobre la relación dosis-respuesta, los estudios completos deben incluir un grupo testigo negativo (punto 18) y un mínimo de tres dosis separadas por un factor que será en general de 2 y nunca superior a 4. Si el producto problema no produce toxicidad en un estudio de determinación del intervalo o según los datos disponibles, la dosis más alta para una administración única debe ser de 2 000 mg/kg de peso corporal. No obstante, si el producto problema provoca toxicidad, la DMT debe ser la mayor dosis administrada y las dosis deben abarcar preferentemente el intervalo desde la dosis máxima hasta una dosis que provoque toxicidad escasa o nula. Si se observa toxicidad para el tejido diana (es decir, el testículo) a todas las dosis utilizadas en el ensayo, se recomienda hacer otro estudio a dosis no tóxicas. Unos estudios destinados a caracterizar de forma más completa la relación cuantitativa dosis-respuesta pueden necesitar más grupos de dosis. Estos límites pueden variar con determinados tipos de productos problema (por ejemplo, productos farmacéuticos de uso humano) a los que se apliquen requisitos específicos. Si el producto problema produce toxicidad, debe seleccionarse la dosis límite más dos dosis más bajas (según lo descrito anteriormente). La dosis límite para un período de administración de 14 días o más es de 1 000 mg/kg de peso corporal/día y, si se trata de períodos de administración de menos de 14 días, la dosis límite será de 2 000 mg/kg peso corporal/día.

▼M8

**Administración de las dosis**

29. A la hora de diseñar el ensayo, debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por lo tanto, cuando esté justificado, podrán elegirse vías de exposición como los alimentos, el agua de bebida, la tópica, la subcutánea, la intravenosa, la oral forzada (por sonda), la inhalación o la implantación. En cualquier caso, la vía debe elegirse de forma que se garantice una exposición adecuada del tejido diana. Normalmente, no se recomienda la inyección intraperitoneal, a no ser que esté justificada científicamente, ya que, por lo general, no se trata de una vía fisiológicamente pertinente de exposición humana. Si el producto problema se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, en particular en caso de administración única, debe procurarse que el plazo entre el consumo de los alimentos o el agua y el muestreo sea suficiente para permitir la detección de los efectos (véase el punto 33). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por vía oral forzada o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe superar normalmente 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a un máximo de 2 ml/100 g de peso corporal. Si se utilizan volúmenes superiores a estos (en caso de que lo permita la legislación sobre bienestar animal), debe justificarse. La variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración, para garantizar un volumen constante en relación con el peso corporal en todas las dosis.

**Observaciones**

30. Deben hacerse observaciones clínicas generales de los animales de ensayo y registrarse los signos clínicos al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período de mayor intensidad de los efectos previstos tras la administración. Al menos dos veces al día, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Deben pesarse todos los animales al principio del estudio, al menos una vez por semana durante los estudios de administración continuada, y en el momento del sacrificio. En los estudios de al menos una semana de duración, el consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. Si el producto problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie esta y al menos una vez por semana. Los animales que presenten signos de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse antes de que termine el período del ensayo (13).

**Preparación de los cromosomas**

31. Inmediatamente después del sacrificio, se obtienen suspensiones de células germinales de uno o de ambos testículos, se exponen a una solución hipotónica y se fijan según protocolos establecidos [p. ej., (2) (14) (15)]. A continuación, se extienden las células en portaobjetos y se tiñen (16) (17). Todos los portaobjetos se codifican de manera que el examinador no conozca su identidad.

**Examen**

32. Deben examinarse al menos 200 metafases bien extendidas de cada animal (3) (11). Si la frecuencia histórica de los testigos negativos es < 1 %, debe evaluarse más de 200 células/animal para aumentar la potencia estadística (3). Deben utilizarse métodos de tinción que permitan la identificación del centrómero.

33. Las aberraciones de tipo cromosoma y de tipo cromátida deben registrarse por separado y clasificarse en subtipos (roturas, intercambios). Las separaciones se registrarán, pero no se tendrán en cuenta para determinar si un producto induce un aumento significativo de la incidencia de células con aberraciones cromosómicas. Los procedimientos utilizados en el laboratorio deben garantizar que el análisis de las aberraciones cromosómicas es realizado por examinadores bien formados. Reconociendo que los métodos de

▼M8

preparación de los portaobjetos provocan con frecuencia la rotura de células en metafase y la consiguiente pérdida de cromosomas, las células examinadas deben, por tanto, contener un número de centrómeros no inferior a $2n \pm 2$, donde $n$ es el número de cromosomas haploides de la especie.

34. Aunque la finalidad del ensayo es detectar aberraciones cromosómicas estructurales, es importante registrar las frecuencias de las células poliploides y las células con cromosomas endorreduplicados cuando se observan estos hechos (véase el punto 44).

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

35. Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de cuadro. Se determinará respecto a cada animal el número de células con aberraciones cromosómicas estructurales y el número de aberraciones cromosómicas por célula. Las aberraciones de tipo cromosoma y de tipo cromátida, clasificadas por subtipos (roturas, intercambios), deben enumerarse por separado con su número y frecuencia en relación con los grupos experimentales y testigos. Las separaciones (gaps) se registran por separado. La frecuencia de las separaciones se recoge en el informe, pero por lo general no se incluye en el análisis de la frecuencia total de aberraciones cromosómicas estructurales. Se recoge en el informe el porcentaje de poliploidía y de células con cromosomas endorreduplicados, cuando se observan.

36. Deben indicarse los datos sobre toxicidad y signos clínicos (según el punto 30).

**Criterios de aceptabilidad**

37. Los siguientes criterios determinan la aceptabilidad de un ensayo.

— El testigo negativo en paralelo es coherente con los niveles publicados de los datos históricos de los testigos negativos, de los que generalmente se espera que presenten una proporción de células que hayan sufrido aberraciones cromosómicas $> 0$ % y $\leq 1{,}5$ %, y con los datos de testigos históricos del laboratorio, si estos están disponibles (véanse los puntos 10 y 18).

— Los testigos positivos en paralelo inducen respuestas coherentes con las normas publicadas sobre los datos históricos de los testigos positivos, o con la base de datos de testigos históricos positivos del laboratorio, si estos están disponibles, y producen un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo (véanse los puntos 17 y 18).

— Se han analizado números apropiados de células y de dosis (véanse los puntos 28 y 32).

— Los criterios para la selección de la dosis más elevada son coherentes con los descritos en los puntos 25 y 26.

38. Si se observan tanto mitosis como meiosis, debe determinarse la proporción entre las mitosis de los espermatogonios y las metafases meióticas primera y segunda, como medida de la citotoxicidad para todos los animales tratados y testigo negativo, en una muestra total de 100 células en división por animal. Si se observan mitosis únicamente, se determinará el índice mitótico al menos en 1 000 células por animal.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

39. Deben analizarse al menos tres grupos tratados con el producto problema a fin de obtener datos suficientes para el análisis de la relación dosis-respuesta.

▼**M8**

40. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si:

— al menos una de las dosis de ensayo produce un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo;

— el aumento está relacionado con la dosis al menos en un momento de muestreo; y

— alguno de los resultados está fuera del intervalo aceptable de los datos de los testigos negativos, o de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (p. ej., límite del control del 95 % según la distribución de Poisson), si están disponibles.

El producto problema se considera entonces capaz de inducir aberraciones cromosómicas en los espermatogonios de los animales de ensayo. En la bibliografía se encuentran también recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (11) (18). Las pruebas estadísticas utilizadas deben considerar como unidad experimental al animal.

41. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si:

— ninguna de las dosis de ensayo presenta un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo;

— no hay ningún aumento relacionado con la dosis en ninguna de las condiciones experimentales; y

— todos los resultados están dentro del intervalo aceptable de los datos de los testigos negativos, o de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (p. ej., límite del control del 95 % según la distribución de Poisson), si están disponibles.

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir aberraciones cromosómicas en los espermatogonios de los animales de ensayo. En la bibliografía se encuentran también recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (11) (18). Un resultado negativo no excluye la posibilidad de que el producto pueda inducir aberraciones cromosómicas en fases de desarrollo posteriores no estudiadas, o mutaciones génicas.

42. No se requiere ninguna verificación de una respuesta positiva clara o negativa clara.

43. Si la respuesta no es claramente negativa o positiva, y para ayudar a determinar la pertinencia biológica de un resultado (p. ej., un incremento débil o dudoso), los datos deben ser evaluados por expertos o mediante otras investigaciones utilizando los datos experimentales existentes, como la consideración de si el resultado positivo se encuentra fuera del intervalo aceptable de datos de los testigos negativos o de los datos históricos de los testigos negativos del laboratorio (19).

44. En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos puede no permitir que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo, por lo que se considerará dudoso.

45. El aumento del número de células poliploides puede indicar que el producto problema es capaz de inhibir procesos mitóticos y de inducir aberraciones cromosómicas numéricas (20). Un aumento del número de células con cromosomas endorreduplicados puede indicar que el producto problema es capaz de inhibir el progreso del ciclo celular (21) (22), que es un mecanismo de inducir alteraciones cromosómicas numéricas diferente de la inhibición de procesos mitóticos (véase el punto 2). Por consiguiente, deben consignarse por separado la incidencia de células poliploides y de células con cromosomas endorreduplicados.

▼**M8**

**Informe del ensayo**

46. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Resumen.*

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se conocen;

— estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

— medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

*Sustancias de un solo componente:*

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

*Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:*

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Preparación del producto problema:*

— justificación de la elección del vehículo;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo.

— preparación de formulaciones para la administración con los alimentos, con el agua de bebida o por inhalación;

— determinaciones analíticas de las formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, concentraciones nominales) si se realizan.

*Animales de ensayo:*

— especie y cepa utilizadas y justificación de su utilización;

— número y edad de los animales;

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;

— método para la identificación individual de los animales;

— en el caso de estudios a corto plazo: peso individual de los animales al inicio y al final del ensayo; en el caso de estudios de duración superior a una semana: pesos corporales individuales durante el estudio y consumo de alimentos. Deben incluirse el intervalo, la media y la desviación típica de los pesos corporales de cada grupo.

*Condiciones del ensayo:*

— datos de los testigos positivos y negativos (vehículo o disolvente);

▼**M8**

— datos del estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo;

— justificación de la selección de las dosis;

— justificación de la elección de la vía de administración;

— datos de la preparación del producto problema;

— datos sobre la administración del producto problema;

— fundamento de la elección del momento del sacrificio;

— métodos de determinación de la toxicidad para los animales, incluidos los eventuales análisis histopatológicos o hematológicos, y frecuencia con que se han medido los pesos corporales y se han realizado las observaciones de los animales;

— métodos de comprobación de que el producto problema ha alcanzado el tejido diana, o la circulación general, si se obtienen resultados negativos;

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) calculadas a partir del consumo y de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida, en su caso;

— datos de la calidad de los alimentos y el agua;

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y muestreo y justificación de las decisiones;

— método de sacrificio;

— método de analgesia (en su caso);

— procedimientos para aislar los tejidos;

— identidad del producto que detiene la división celular en la metafase, concentración empleada y duración del tratamiento,

— métodos de preparación de los portaobjetos;

— criterios de examen de las aberraciones;

— número de células analizadas por animal;

— criterios empleados para considerar que los estudios son positivos, negativos o dudosos.

*Resultados:*

— estado de los animales antes del ensayo y a lo largo de este, incluidos los signos de toxicidad;

— peso corporal y de los órganos en el momento del sacrificio (si se emplean varios tratamientos, pesos corporales tomados durante la pauta de tratamiento);

— signos de toxicidad;

— índice mitótico;

— relación entre el número de espermatogonios con mitosis y el número de metafases meióticas primera y segunda, u otras pruebas de exposición del tejido diana;

— tipo y número de aberraciones observadas en cada animal por separado;

— número total de aberraciones por grupo, con medias y desviaciones típicas;

▼**M8**

— número de células con aberraciones por grupo, con medias y desviaciones típicas;

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible;

— análisis estadísticos y métodos aplicados;

— datos de los testigos negativos en paralelo;

— datos históricos de testigos negativos, con intervalos, medias, desviaciones típicas y un intervalo de confianza del 95 % (en su caso), o datos históricos de los testigos negativos históricos publicados utilizados para determinar la aceptabilidad de los resultados de los ensayos;

— datos sobre los testigos positivos en paralelo;

— variaciones de la ploidía, en su caso, incluidas las frecuencias de poliploidía y/o de células endorreduplicadas.

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OCDE, París.

(2) Adler, I.-D. (1984). Cytogenetic Tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J. M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275-306.

(3) Adler I.-D., Shelby M. D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313-318.

(4) Russo, A. (2000). *In Vivo* Cytogenetics: Mammalian Germ Cells. Mutation Res., 455, 167-189.

(5) Hess, R.A. and de Franca L.R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis, Cheng C.Y. (Ed.) Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, pp. 1-15.

(6) Adler, I.-D. (1974). Comparative Cytogenetic Study after Treatment of Mouse Spermatogonia with Mitomycin C, Mutation. Res., 23(3): 368-379.Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel C., Lambert B. and Magnusson J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477-484.

(7) Cattanach, B.M., and Pollard C.E. (1971). Mutagenicity Tests with Cyclohexylamine in the Mouse, Mutation Res., 12, 472-474.

(8) Cattanach, B.M., and Williams, C.E. (1971). A search for Chromosome Aberrations Induced in Mouse Spermatogonia by Chemical Mutagens, Mutation Res., 13, 371-375.

(9) Rathenburg, R. (1975). Cytogenetic Effects of Cyclophosphamide on Mouse Spermatogonia, Humangenetik 29, 135-140.

▼M8

(10) Shiraishi, Y. (1978). Chromosome Aberrations Induced by Monomeric Acrylamide in Bone Marrow and Germ Cells of Mice, Mutation Res., 57(3): 313–324.

(11) Adler I-D., Bootman, J., Favor, J., Hook, G., Schriever-Schwemmer, G., Welzl, G., Whorton, E., Yoshimura, I. and Hayashi, M. (1998). Recommendations for Statistical Designs of *In Vivo* Mutagenicity Tests with Regard to Subsequent Statistical Analysis, Mutation Res., 417, 19–30.

(12) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313-319.

(13) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(14) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207-209.

(15) Hsu, T.C., Elder, F. and Pathak, S. (1979). Method for Improving the Yield of Spermatogonial and Meiotic Metaphases in Mammalian Testicular Preparations. Environ. Mutagen., 1, 291-294.

(16) Evans, E.P., Breckon, G., and Ford, C.E. (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289-294.

(17) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G. and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetics Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115-141.

(18) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G.E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Papworth, D.G.and Savage, J.R.K. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D.J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184-232.

(19) Hayashi, M., Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H.-J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data. Mutation Res., 723, 87-90.

(20) Warr T.J., Parry E.M. and Parry J.M. (1993). A Comparison of Two *In Vitro* Mammalian Cell Cytogenetic Assays for the Detection of Mitotic Aneuploidy Using 10 Known or Suspected Aneugens, Mutation Res., 287, 29-46.

(21) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J.E. (1983). Aphidicolin-Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells. Cancer Res., 43, 1362-1364.

(22) Locke-Huhle, C. (1983). Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha-Radiation Induced G2 Arrest. Mutation Res., 119, 403-413.

▼M8

*Apéndice*

DEFINICIONES

Aneuploidía: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas que afecta a uno o varios cromosomas, pero no a dotaciones completas de cromosomas (poliploidía).

Centrómero: Región o regiones de un cromosoma con las que se asocian las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

Producto: Sustancia o mezcla.

Diversidad de los cromosomas: Diversidad de las formas (p. ej., metacéntricos, acrocéntricos, etc.) y tamaños de los cromosomas.

Aberración de tipo cromátida: Lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura de cromátidas solas o en la rotura y reunión entre cromátidas.

Aberración de tipo cromosoma: Lesión cromosómica estructural que consiste en la rotura, o en la rotura y reunión, de ambas cromátidas en el mismo sitio.

Clastógeno: Producto que provoca aberraciones cromosómicas estructurales en poblaciones de células u organismos.

Separación (gap): Lesión acromática más estrecha que la anchura de una cromátida, y con alteración mínima de la alineación de las cromátidas.

Genotoxicidad: Término general que engloba todos los tipos de lesión del ADN o de los cromosomas, con inclusión de roturas, deleciones, aductos, modificaciones y uniones de nucleótidos, reorganizaciones, mutaciones, aberraciones cromosómicas y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en lesiones cromosómicas estables.

Índice mitótico (IM): Relación entre el número de células en metafase y el número total de células observadas en una población celular; indica el grado de proliferación de dicha población.

Mitosis: División del núcleo celular, generalmente compuesta por profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

Mutágeno: Agente que provoca un cambio hereditario en una o varias secuencias de pares de bases del ADN en los genes o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).

Anomalía numérica: Cambio del número de cromosomas respecto al número normal característico de los animales empleados.

Poliploidía: Múltiplo del número cromosómico haploide ($n$) superior al diploide ($3n$, $4n$, etc.).

Aberración estructural: Cambio de la estructura cromosómica detectable mediante examen microscópico de la metafase de la división celular, observado como deleciones y fragmentos, intercambios.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

UVCB: Sustancias químicas de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

▼M7

_____

▼B

B.25. **TRANSLOCACIÓN HEREDITARIA EN EL RATÓN**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba de translocación hereditaria en el ratón descubre alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas en las células embrionarias de mamíferos, tal como se ponen de manifiesto en la descendencia de primera generación. Los tipos de alteraciones cromosómicas apreciados son translocaciones recíprocas y, si se incluye la descendencia femenina, pérdida del cromosoma X. Los portadores de translocaciones y las hembras XO muestran una fertilidad reducida que permite la selección de una descendencia $F_1$ para practicar un análisis citogenético. Una esterilidad total es consecuencia de tipos de translocación determinados (autosoma X y tipo c-t). Las translocaciones se observan citogenéticamente en las células meióticas en diacinesis-metafase I de los individuos machos, ya sean machos $F_1$ o hijos de hembras $F_1$. Las hembras XO se identifican citogenéticamente por la presencia de solo 39 cromosomas en las mitosis de la médula ósea.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

*Preparativos*

Las sustancias objeto de estudio se disuelven en solución salina isotónica. Si son insolubles en agua, se disuelven o suspenden en vehículos apropiados. Se emplean soluciones recién preparadas de la sustancia estudiada. Si se utiliza un vehículo para facilitar la administración, no debe alterar el compuesto analizado ni provocar efectos tóxicos.

Vía de administración

Las vías de administración usuales son la intubación oral y la inyección intraperitoneal, aunque pueden ser apropiadas otras vías.

Animales de experimentación

Para facilitar la reproducción y la verificación citológica, estos experimentos se realizan con ratones; no es preciso que sean de una cepa determinada. Sin embargo, el tamaño medio de una camada de la cepa empleada deberá ser superior a 8, y relativamente constante.

Se utilizarán animales sanos y sexualmente maduros.

▼B

Número de animales

El número de animales necesario depende de la frecuencia de translocaciones espontáneas, así como del índice mínimo de inducción preciso para obtener un resultado positivo.

La prueba suele realizarse mediante análisis de la descendencia masculina $F_1$. Al menos 500 descendientes machos $F_1$ se analizan por grupo de dosis. Si se incluye la descendencia femenina $F_1$ son necesarios 300 machos y 300 hembras.

Uso de controles negativos y positivos

Debe disponerse de datos sobre controles adecuados procedentes de pruebas realizadas simultáneamente y de controles históricos. Si existen resultados aceptables de controles positivos procedentes de experimentos efectuados en fecha reciente en el mismo laboratorio, pueden utilizarse en lugar de un control positivo simultáneo.

Dosis

Se prueba una dosis, por lo general la máxima asociada con la producción de efectos tóxicos mínimos pero que no altere el comportamiento reproductor ni la supervivencia. Para establecer una relación dosis/respuesta, son necesarias otras dos dosis. En caso de sustancias atóxicas, la exposición se efectuará a la dosis máxima posible.

*Procedimiento*

Tratamiento y apareamiento

Existen dos programas de tratamiento. De ellos, el más utilizado es la administración única de la sustancia estudiada. La sustancia también puede administrarse los 7 días de la semana durante 35 días. El número de apareamientos tras el tratamiento dependerá del programa de administración, y garantizará la obtención de muestras de todos los estadios de las células embrionarias tratadas. Al final del período de apareamiento, se coloca a las hembras en jaulas individuales. Cuando dan a luz, se registra la fecha, el tamaño de la camada y el sexo de los descendientes. Se desteta a toda la descendencia masculina y se descarta toda la femenina, salvo si se incluyen en el experimento.

Búsqueda de los heterocigotos de translocación

Se utiliza uno de los dos métodos posibles:

— estudio de la fertilidad de la descendencia $F_1$, y verificación posterior de posibles portadores de translocaciones por análisis citogenéticos,

— análisis citogenético de toda la progenie $F_1$ masculina sin selección previa mediante estudio de fertilidad.

a) Estudio de la fertilidad

Es posible determinar la fertilidad reducida de un individuo $F_1$ observando el tamaño de la camada, analizando el contenido uterino de su compañera femenina o por ambos medios.

Es necesario fijar los criterios de determinación de la fertilidad normal y reducida de la cepa de ratón utilizada.

▼B

*Observación del tamaño de la camada:* Los machos $F_1$ sometidos a estudio se colocan en jaulas individuales con hembras procedentes del mismo experimento o de la colonia. Las jaulas se inspeccionan a diario a partir de los 18 días tras el apareamiento. Se registran, en el momento del nacimiento, el tamaño de la camada y el sexo de la descendencia $F_2$, y se descartan luego las crías. Si se estudia la descendencia femenina $F_1$, se conserva la descendencia $F_2$ procedente de camadas pequeñas para un análisis en mayor profundidad. Las hembras portadoras de una translocación se someten a verificación por análisis citogenético de una translocación en cualquiera de sus descendientes machos. Las hembras XO se identifican por la modificación de sexos en su descendencia, que pasa de 1:1 a 1:2 machos/hembras. En un método secuencial, los machos $F_1$ normales no se someten a nueva verificación si la primera camada $F_2$ alcanza o supera un valor normal predeterminado; de lo contrario, se observan una segunda y una tercera camadas $F_2$.

Los animales $F_1$ que no puedan clasificarse como normales tras observación de hasta un máximo de tres camadas $F_2$ se someten a un nuevo control mediante análisis del contenido uterino de sus compañeras femeninas, o sufren directamente análisis citogenético.

*Análisis del contenido uterino:* La reducción del tamaño de las camadas en los portadores de translocaciones se debe a la muerte de embriones, por lo que un número alto de implantes muertos indica la presencia de una translocación en el animal sometido a la prueba. Cada macho $F_1$ estudiado se aparea con 2 o 3 hembras. Se comprueba si existe concepción mediante el examen matinal diario para descubrir la presencia de tapones vaginales. Las hembras se sacrifican 14 o 16 días después, y se registra el número de implantes vivos y muertos presentes en su útero.

b) Análisis citogenético

Se obtienen preparaciones de testículos por el método de secado con aire. Los portadores de translocaciones se identifican por la presencia de configuraciones multivalentes en diacinesis metafase I en los espermatocitos primarios. La observación de al menos dos células con una asociación multivalente constituye la prueba necesaria de que el animal estudiado es portador de una translocación.

Si no se ha realizado selección mediante análisis de la fecundidad, se practica estudio citogenético en todos los machos $F_1$. Deben analizarse al microscopio un mínimo de 25 células en diacinesis/metafase I por macho. En los machos $F_1$ con testículos pequeños y que presenten una detención meiótica antes de la diacinesis, o en las hembras $F_1$ que se sospeche sean XO, es necesario el examen de las metafases mitóticas en los espermatogonios o en la médula ósea. La presencia de un cromosoma desusadamente largo o corto en 10 células, demuestra la existencia de una translocación especial que origina la esterilidad del macho (tipo c-t). Algunas translocaciones X autosomas que provocan la esterilidad del macho solo pueden identificarse mediante un análisis de las bandas de cromosomas mitóticos. La presencia de 39 cromosomas en la totalidad de 10 micosis es demostrativa de un estado XO en una hembra.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se presentarán en forma de tablas.

Se registran, en el nacimiento y el destete para cada período de apareamiento, el tamaño medio de las camadas y la relación entre sexos.

▼B

En lo que respecta a la evaluación de la fertilidad de los animales $F_1$, se expondrán el tamaño medio de las camadas procedentes de todos los apareamientos normales, así como el tamaño de cada una de las surgidas de animales $F_1$ portadores de translocación. En cuanto al análisis del contenido uterino, se harán constar el número medio de implantes vivos y muertos producto de apareamientos normales, y el de implantes vivos y muertos de cada apareamiento de portadores de translocación.

Respecto al análisis citogenético de la diacinesis-metafase I, se enumerarán el número de tipos diferentes de configuraciones multivalentes y el número total de células en cada portador de translocación.

Se comunicarán el número total de apareamientos y la duración del período de apareamiento de los individuos estériles $F_1$. Se facilitarán asimismo el peso de los testículos y detalles del análisis citogenético.

Para hembras XO, se dan resultados del tamaño medio de la camada, de la razón de sexos de la progenie $F_2$ y del análisis citogenético.

Cuando se preseleccionan, por pruebas de fertilidad, posibles $F_1$ portadores de translocación, las tablas deben incluir información relativa a cuántos de estos eran heterocigotos de translocación confirmados.

Se dan también datos de los experimentos de control negativo y control positivo.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DE LA PRUEBA

El informe incluirá los datos siguientes:

— cepa de ratones, edad de los animales, pesos de los animales tratados,

— número de animales reproductores de cada sexo en los grupos experimentales y de control,

— condiciones de la prueba, descripción detallada del tratamiento, niveles de las dosis, disolventes, frecuencia de apareamientos,

— número y sexo de los descendientes por cada hembra, número y sexo de los descendientes criados para análisis de translocación,

— tiempos y criterios de análisis de translocación,

— número y descripción detallada de los portadores de translocación, incluyendo datos de reproducción y de contenido uterino, cuando proceda,

— procedimientos citogenéticos y detalles del análisis microscópico, preferiblemente con fotografías,

— evaluación estadística,

— discusión de resultados,

— interpretación de resultados.

▼B

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

## B.26. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN ROEDORES

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad oral subcrónica reproduce las directrices del documento OCDE TG 408 (1998).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral subcrónica por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda o por administración continuada durante 28 días hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El estudio de 90 días aporta información sobre los peligros que puede presentar para la salud una exposición continuada durante un período prolongado, que abarque la maduración posterior al destete y el crecimiento hasta la edad adulta. La información obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar las dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana.

El presente método hace especial hincapié en los parámetros neurológicos y proporciona una indicación de los efectos sobre el sistema inmunitario y la reproducción. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método sirve para detectar sustancias químicas que pueden tener efectos tóxicos sobre el sistema nervioso, inmunitario o los órganos reproductores, lo cual puede justificar la realización de estudios más exhaustivos.

Véase también la introducción general de la Parte B.

### 1.2. DEFINICIONES

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (por ejemplo, mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

**Posología:** termino general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

**NOAEL:** sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

### 1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra diariamente la sustancia de ensayo por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante 90 días. A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo, así como a los que sobrevivan al final del mismo.

▼B

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación de los animales**

Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Estos se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto.

1.4.2. **Preparación de las dosis**

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

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicológicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en las condiciones de administración.

1.4.3. **Condiciones del ensayo**

1.4.3.1. *Animales de experimentación*

La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Hay que utilizar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio habitual. Las hembras han de ser nulíparas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras el destete y, en cualquier caso, antes de que los animales tengan nueve semanas de edad. Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales empleados ha de ser mínima y no superar el ± 20 % del peso medio de cada sexo. Cuando el ensayo se realice, como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios, animales de la misma cepa y procedencia.

1.4.3.2. *Número y sexo*

Deben utilizarse por lo menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) para cada dosis. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio. Sobre la base de los conocimientos previos relativos a la sustancia química u otra sustancia muy próxima, puede tratarse un lote satélite de 10 animales (5 de cada sexo) en el control y con la dosis más elevada para observar la reversibilidad o persistencia de efectos tóxicos una vez finalizado el tratamiento. La duración del período de observación posterior al tratamiento ha de establecerse adecuadamente en función de los efectos observados.

▼B

1.4.3.3. *Posología*

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el punto 1.4.3.4). Para establecer las dosis pueden emplearse los resultados de los estudios de administración continuada o de determinación de dosis y debe tomarse en consideración toda la información toxicológica y toxicocinética disponible sobre la sustancia de ensayo o productos afines. A menos que las características fisicoquímicas o los efectos biológicos de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis. La dosis mínima será la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 6-10) entre dosis.

El lote de control no recibe la sustancia de ensayo, pero sí recibe el vehículo en caso de que este se utilice para la sustancia. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se emplea un vehículo, el lote de control ha de recibir el mayor volumen utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para saber si la disminución se debe a las características organolépticas o a alteraciones toxicológicas del modelo de ensayo.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo; efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales.

1.4.3.4. *Ensayo límite*

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Administración de las dosis**

Las dosis de ensayo se administran diariamente a los animales durante 90 días. Cualquier otra posología, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal y no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

▼B

En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dicta (ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de 90 días como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, debe emplearse la misma dieta en ambos.

1.5.2. **Observaciones**

El período de observación debe durar al menos 90 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite para las observaciones de seguimiento durante un período adecuado y sin tratamiento, a fin de detectar la persistencia o la desaparición de los efectos tóxicos.

Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales. Se examinan todos los animales al menos dos veces al día, por lo general a primera y a última hora, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

Todos los animales deben someterse al menos a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para poder realizar comparaciones en un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (1).

Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, a ser posible en todos los animales, pero al menos en el lote con la dosis más alta y en el lote de control. Si se observan cambios oculares en esos animales, deben examinarse todos los demás.

Hacia el final del período de exposición, pero en ningún caso antes de la undécima semana, debe evaluarse la reactividad sensorial frente a estímulos de distintos tipos (1) (por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos) (2) (3) (4), la fuerza de prensión (5) y la actividad motriz (6). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

Las observaciones funcionales hacia el final del estudio pueden omitirse si se dispone de datos sobre dichas observaciones realizadas en otros estudios y las observaciones clínicas diarias no ponen de manifiesto alteraciones funcionales.

▼B

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

1.5.2.1. *Peso corporal y consumo de alimentos y agua*

Al menos una vez por semana deben pesarse todos los animales, medirse el consumo de alimentos y, si la sustancia de ensayo se administra con el agua de bebida, también el consumo de agua. Este último puede vigilarse, asimismo, en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra con los alimentos o mediante sonda y la ingestión de agua pueda verse alterada.

1.5.2.2. *Hematología y bioquímica clínica*

Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado y conservarse, si procede, en condiciones adecuadas. Al final del período de ensayo, las muestras se toman justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio.

Deben practicarse los siguientes exámenes hematológicos al final del período de ensayo y con las muestras tomadas a lo largo del mismo: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación sanguínea.

Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos, y especialmente en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes de su sacrificio o como parte del método de sacrificio (aparte de los moribundos o sacrificados a lo largo del ensayo). Al igual que los exámenes hematológicos, los análisis de bioquímica clínica pueden realizarse en muestras tomadas en el transcurso del ensayo. Se recomienda que los animales estén en ayunas desde el día anterior a la toma de muestras ([1]). Los parámetros medidos en el plasma y el suero deben incluir las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, nitrógeno residual en sangre, creatinina, proteínas totales y albúmina, y al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina aminotrans-ferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa o sorbitol deshidroge-nasa). La determinación de otras enzimas (de origen hepático o no) y de ácidos biliares puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.

Pueden realizarse, con carácter facultativo, las siguientes determinaciones en la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas.

Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores séricos de lesiones tisulares generales. Otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo pueden afectar a las funciones metabólicas correspondientes incluyen la concentración de calcio, fósforo, triglicéridos en ayunas, hormonas específicas, metahemoglobina y colinesterasa. Debe valorarse la necesidad de hacer estos análisis con las sustancias de determinadas clases o bien según cada caso.

([1]) El ayuno desde la víspera es preferible para ciertas medidas en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, no obstante, el ayuno desde la víspera puede inferir con el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra en los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Si se opta por el ayuno desde la víspera, las determinaciones de bioquímica clínica deben realizarse después de las observaciones funcionales del estudio.

▼B

Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de las especies y los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

Si los datos disponibles sobre antecedentes no son adecuados, debe plantearse la determinación de variables hematológicas y bioquímicas clínicas antes de iniciar la administración de la sustancia; por lo general, se desaconseja obtener dichos datos antes del tratamiento (7).

1.5.2.3. *Autopsia macroscópica*

Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidí-dimos, útero, ovarios, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse: todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal (cervical, torácica media y lumbar), hipófisis, tiroides, paratiroides, timo, esófago, glándulas salivares, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, páncreas, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, tráquea y pulmones (conservados mediante inflado con fijador, seguido de inmersión), aorta, gónadas, útero, órganos sexuales secundarios, glándula mamaria de las hembras, próstata, vejiga urinaria, vesícula biliar (ratón), ganglios linfáticos (preferentemente un ganglio relacionado con la vía de administración y otro distante de la misma para tener en cuenta los efectos sistémicos), nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, una sección de la médula ósea (y/o médula ósea aspirada y recién montada), piel y ojos (si se han observado cambios durante los exámenes oftalmológicos). Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. También deben conservarse todos los posibles órganos diana, según las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo.

1.5.2.4. *Examen histopatológico*

Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, estos exámenes se ampliarán a animales de todos los demás lotes tratados.

Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

▼B

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.

Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas,

— identificación química,

— vehículo (si procede): justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— especie y cepa empleada,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— justificación de la elección de las dosis,

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado,

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

2.2.4. **Resultados:**

— peso corporal y cambios en el mismo,

— consumo de alimentos y de agua, en su caso,

— datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad,

▼B

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no),

— resultados del examen oftalmológico,

— evaluación de la actividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz (si procede),

— pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia,

— pruebas de bioquímica clínica con los correspondientes valores de referencia,

— peso corporal y peso de los órganos en el momento del sacrificio, y relación peso órgano/peso corporal,

— hallazgos de la autopsia,

— descripción pormenorizada de todas las observaciones histopatológicas,

— datos sobre la absorción, si los hay,

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

3. **REFERENCIAS**

(1) IPCS (1986). Principies and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace. R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9. 691-704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, .M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Foreand Hind-limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). «Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies», Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198-201.

▼B

## B.27. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA TOXICIDAD ORAL POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA (90 DÍAS) EN NO ROEDORES

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad oral subcrónica reproduce las directrices del documento OCDE TG 409 (1998).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Al determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia química, el estudio de la toxicidad oral subcrónica por administración continuada puede estar indicado cuando los ensayos de toxicidad aguda o por administración continuada durante 28 días hayan proporcionado información relativa a la toxicidad. El estudio de 90 días aporta información sobre los peligros que puede presentar para la salud una exposición continuada durante un período de crecimiento rápido hasta el principio de la edad adulta. La información obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar las dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana.

El presente ensayo pone de manifiesto los efectos adversos, en animales no roedores, de la exposición a sustancias químicas y está indicado solo en los casos siguientes:

— cuando los efectos observados en otros estudios indiquen la necesidad de aclarar y precisar algunos aspectos en una especie no roedora, o

— cuando los estudios toxicocinéticos indiquen que los animales de experimentación idóneos han de pertenecer a una especie determinada no roedora, o

— cuando haya otros motivos concretos para emplear una especie no roedora.

Véase también la introducción general de la Parte B.

### 1.2. DEFINICIONES

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (por ejemplo, mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

**Posología:** término general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

**NOAEL:** sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

### 1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra diariamente la sustancia de ensayo por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante 90 días. A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo, así como a los que sobrevivan al final del mismo.

▼B

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Selección de la especie animal**

Suele emplearse el perro, preferiblemente de una raza definida. Con frecuencia se utiliza el sabueso. También pueden emplearse otras especies como el cerdo o el cerdo enano. No se recomiendan los primates; su uso ha de justificarse. Deben emplearse animales jóvenes y sanos y, en el caso del perro, la administración de sustancia de ensayo debe comenzar preferiblemente a la edad de 4-6 meses, pero nunca después de los 9 meses. Si el ensayo se realiza como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios animales de la misma especie y raza.

1.4.2. **Preparación de los animales**

Deben emplearse animales jóvenes y sanos, que se hayan mantenido en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. La duración de la aclimatación dependerá de la especie de ensayo seleccionada y de su procedencia: se recomienda un mínimo de 5 días para los perros y los cerdos criados con ese propósito en un animalario del laboratorio, y de dos semanas si proceden de una fuente exterior. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Estos se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se ponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto.

1.4.3. **Preparación de las dosis**

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

En caso necesario, la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características toxicoló-gicas. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia de ensayo en las condiciones de administración.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Número y sexo de los animales**

Deben utilizarse por lo menos 8 animales (4 hembras y 4 machos) para cada dosis. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio. El número de animales vivos al término del estudio debe permitir una evaluación significativa de los efectos tóxicos. Sobre la base de los conocimientos previos relativos a la sustancia química u otra sustancia muy próxima, puede tratarse un lote satélite de 8 animales (4 de cada sexo) en el control y con la dosis más elevada para observar la reversibilidad o persistencia de efectos tóxicos una vez finalizado el tratamiento. La duración del período de observación posterior al tratamiento ha de establecerse adecuadamente en función de los efectos observados.

▼B

1.5.2. **Posología**

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el punto 1.5.3). Para establecer las dosis pueden emplearse los resultados de los estudios de administración continuada o de determinación de dosis y debe tomarse en consideración toda la información toxi-cológica y toxicocinética disponible sobre la sustancia de ensayo o productos afines. A menos que las características fisicoquímicas o los efectos biológicos de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis. La dosis mínima será la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 6-10) entre dosis.

El lote de control no recibe la sustancia de ensayo, pero sí recibe el vehículo en caso de que este se utilice para la sustancia. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se emplea un vehículo, el lote de control ha de recibir el mayor volumen utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para saber si la disminución se debe a las características organolépticas o a alteraciones toxicológicas del modelo de ensayo.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo, efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales.

1.5.3. **Ensayo límite**

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5.4. **Administración de las dosis**

Las dosis de ensayo se administran diariamente a los animales durante 90 días. Cualquier otra posología, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. Por lo general, el volumen ha de ser el mínimo posible. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

▼B

En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda o en cápsulas, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal. Si se realiza un estudio de 90 días como fase previa de un estudio de toxicidad crónica a largo plazo, debe emplearse la misma dieta en ambos.

1.5.5. **Observaciones**

El período de observación debe durar al menos 90 días. Deben mantenerse animales en un lote satélite para las observaciones de seguimiento durante un período adecuado y sin tratamiento, a fin de detectar la persistencia o la desaparición de los efectos tóxicos.

Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales. Se examinan todos los animales al menos dos veces al día, por lo general a primera y a última hora, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

Todos los animales deben someterse al menos a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para poder realizar comparaciones en un mismo sujeto) y, después, a una por semana. Dichas observaciones han de efectuarse, si es posible, fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y de preferencia siempre a la misma hora. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos de toxicidad han de anotarse cuidadosamente, así como el momento de aparición, la gravedad y la duración. Las observaciones deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos.

Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, a ser posible, de todos los animales, pero al menos en el lote con la dosis más alta y en el lote de control. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás.

1.5.5.1. *Peso corporal y consumo de alimentos y agua*

Al menos una vez por semana deben pesarse todos los animales, medirse el consumo de alimentos y, si la sustancia de ensayo se administra con el agua de bebida, también el consumo de agua. Este último puede vigilarse, asimismo, en los estudios en que la sustancia de ensayo se administra con los alimentos o mediante sonda y la ingestión de agua pueda verse alterada.

▼B

1.5.5.2. *Hematología y bioquímica clínica*

Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado y conservarse, si procede, en condiciones adecuadas. Al final del período de ensayo, las muestras se toman justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio.

Al principio del ensayo y, a continuación, bien una vez al mes bien a la mitad del período de ensayo, así como al término del mismo, debe practicarse un examen hematológico) que incluya hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida de la capacidad de coagulación como el tiempo de coagulación, de protrombina o de trom-boplastina.

Deben hacerse determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos, y especialmente en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales al principio del ensayo y, a continuación, bien una vez al mes bien a la mitad del período de ensayo, así como al término del mismo. Debe estudiarse el equilibrio electrolítico, el metabolismo glucídico y las funciones hepática y renal. La elección de determinados análisis dependerá de las observaciones sobre el modo de actuación de la sustancia de ensayo. Los animales deben estar en ayunas antes de las tomas de sangre, durante un período adecuado según la especie. Se propone determinar el calcio, fósforo, cloro, sodio, potasio, glucosa en ayunas, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, ornitina descarboxilasa, gamma-gluta-mil transpeptidasa, nitrógeno residual, albúmina, creatinina en sangre, bilirrubina total y proteínas séricas totales.

Deben practicarse análisis de orina, como mínimo, al inicio, a la mitad y al final del ensayo, utilizando la recogida programada, con el fin de estudiar los parámetros siguientes: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.

Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores de lesiones tisulares generales. Para realizar una evaluación toxicológica adecuada pueden ser necesarias otras determinaciones como el análisis de los lípidos, hormonas, equilibrio ácido-básico, metahemoglobina e inhibición de la colinesterasa. Si es preciso, pueden realizarse análisis de bioquímica clínica adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados. Debe valorarse la necesidad de hacer estos análisis con las sustancias de determinadas clases o bien según cada caso.

Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de las especies y los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

1.5.5.3. *Autopsia macroscópica*

Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado y la vesícula biliar, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimos, ovarios, útero, glándulas tiroides y paratiroides, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

▼B

Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse: todas las lesiones macroscópicas, encéfalo (zonas representativas, con inclusión del cerebro, cerebelo y protuberancia), médula espinal (cervical, torácica media y lumbar), hipófisis, ojos, tiroides, paratiroides, timo, esófago, glándulas salivares, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, vesícula biliar, páncreas, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, tráquea y pulmones, aorta, gónadas, útero, órganos sexuales secundarios, glándula mamaria de las hembras, próstata, vejiga urinaria, ganglios linfáticos (de preferencia un ganglio relacionado con la vía de administración y otro distante de la misma para tener en cuenta los efectos sistémicos), nervios periféricos (ciático o tibial), preferentemente muy próximos al músculo, una sección de la médula ósea (y/o médula ósea aspirada y recién montada) y piel. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. También deben conservarse todos los posibles órganos diana, según las propiedades conocidas de la sustancia de ensayo.

1.5.5.4. *Examen histopatológico*

Es preciso practicar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados, al menos, de todos los animales del lote expuesto a la dosis más elevada y del lote de control. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el lote con la dosis más elevada, este examen se ampliará a animales de todos los demás lotes tratados.

Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas.

Si se utiliza un lote satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos que presenten efectos en los grupos tratados.

## 2. RESULTADOS E INFORME

### 2.1. RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión.

Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio.

### 2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

▼B

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas,

— identificación química,

— vehículo (si procede): justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— especie y cepa empleada,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— justificación de la elección de las dosis,

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado,

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

2.2.4. **Resultados:**

— peso corporal y cambios en el mismo,

— consumo de alimentos y de agua, en su caso,

— datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad,

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no),

— examen oftalmológico,

— pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia,

— pruebas de bioquímica clínica con los correspondientes valores de referencia,

— peso corporal y peso de los órganos en el momento del sacrificio, y relación peso órgano/peso corporal,

— hallazgos de la autopsia,

— descripción pormenorizada de todas las observaciones histopatológicas,

— datos sobre la absorción, si los hay,

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

▼B

B.28. **TOXICIDAD DÉRMICA SUBCRÓNICA ENSAYO DE 90 DÍAS EN ROEDORES**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se aplican a diario dosis crecientes de la sustancia estudiada en la piel de animales de experimentación integrados en varios grupos, a razón de una dosis por grupo durante un período de 90 días. Durante el período de aplicación se observa diariamente a los animales en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren durante la prueba se someten a autopsia, que se practica también a los supervivientes al concluir el estudio.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparativos**

Se mantiene a los animales en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Antes de comenzarla, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Antes de proceder a la aplicación, se elimina el pelo de la región dorsal del tronco de los animales. Puede emplearse afeitado, pero deberá practicarse aproximadamente 24 horas antes de la prueba. Suelen ser necesarios cortes o afeitados reiterados del pelo, más o menos a intervalos semanales. Al practicarlos, hay que cuidar de no lesionar la piel. Deberá dejarse despejada, para la aplicación de la sustancia en estudio, una superficie no inferior al 10 % de la corporal. Para decidir la zona que debe despejarse y las dimensiones de la superficie a tratar, se tendrá en cuenta el peso del animal. Cuando se prueben sólidos, que pueden pulverizarse si se considera oportuno, se humedecerá lo suficiente la sustancia estudiada con agua o, en caso necesario, un vehículo apropiado para garantizar un buen contacto con la piel. Las sustancias líquidas se emplean por lo general sin diluir. Se practican aplicaciones diarias 5 o 7 días a la semana.

*Condiciones del ensayo*

Animales de experimentación

Pueden emplearse ratas, conejos o cobayas adultos. Es posible emplear otras especies, pero su uso exigiría justificación. Al principio de la prueba, los pesos no diferirán en un porcentaje superior al ± 20 % del peso medio. Cuando se realice una prueba dérmica subcrónica como preliminar a una de índole crónica, se utilizará en ambas la misma especie y cepa.

▼B

Número y sexo

Se utilizarán al menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) con piel sana para cada dosis. Las hembras serán nulíparas y no estarán preñadas. Si está previsto el sacrificio de algunos animales durante la prueba, debe aumentarse su número en una cantidad igual a la de los que vayan a sacrificarse antes de terminar el estudio. Además, puede tratarse a un grupo satélite de 20 animales (10 de cada sexo) con la dosis más alta durante 90 días para observar en ellos la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de efectos tóxicos durante 28 días tras el tratamiento.

Dosis

Se utilizarán al menos tres niveles posológicos y un control, o un control para el vehículo si se emplea este. El período de exposición no será inferior a 6 horas diarias. La aplicación de la sustancia de prueba debe hacerse a las mismas horas todos los días, y la cantidad del producto se ajustará a intervalos (semanales o quincenales) de forma que se mantenga una dosis constante en relación con el peso del animal. Salvo por la omisión de la sustancia estudiada, los animales del grupo de control deben recibir un trato idéntico al de los integrantes del grupo de prueba. Cuando se utilice un vehículo para facilitar la administración, el grupo de control lo recibirá de igual modo que los grupos tratados, y en cantidad igual a la administrada al grupo con dosis más alta. La dosis más alta debe originar efectos tóxicos, pero producir pocos fallecimientos, o ninguno. La dosis más baja no debe originar signo alguno de toxicidad. Cuando se disponga de una estimación válida de la exposición humana, la dosis mínima será superior a ese valor. Lo ideal sería que la dosis media produjera el efecto tóxico mínimo observable. Si se emplea más de una dosis intermedia, la diferencia entre dosis será suficiente para que los efectos tóxicos resultantes sean escalonados. En los grupos con dosis bajas e intermedias, así como en los controles, la mortalidad debe ser baja, a fin de permitir una evaluación significativa de los resultados.

Si la aplicación de la sustancia probada provoca una irritación cutánea grave, se reducirán las concentraciones, lo que quizá origine una reducción, o la ausencia, de otros efectos tóxicos con la dosis alta. Si la piel ha sufrido lesiones importantes, quizá sea necesario dar por concluido el estudio y emprender uno nuevo a concentraciones menores.

*Prueba de límite*

Si una experiencia previa realizada con una dosis de 1 000 mg/kg, o superior, en función de la posibilidad de exposición humana (siempre que esta se conozca) no ha provocado efecto tóxico alguno, cabe considerar inútil la continuación de la experiencia.

*Período de observación*

Es preciso observar a diario a los animales de experimentación en busca de signos de toxicidad. Hay que tomar nota del momento del fallecimiento y del de aparición y desaparición de signos de toxicidad.

▼B

*Procedimiento*

Los animales se alojarán en jaulas individuales. El régimen ideal comprende la administración, a los animales, de la sustancia ensayada los 7 días de la semana durante un período de 90 días.

Los animales de grupos satélites destinados a observaciones complementarias deben observarse 28 días más sin tratamiento para apreciar la recuperación de los efectos tóxicos, o su persistencia. El período de exposición diario será de 6 horas.

La sustancia estudiada se aplicará uniformemente sobre una zona que corresponda aproximadamente al 10 % de la superficie corporal total. En caso de sustancias muy tóxicas, la zona tratada puede ser inferior, pero se cubrirá con una capa lo más uniforme y delgada posible.

Durante la exposición, la sustancia estudiada se mantiene en contacto con la piel con ayuda de un apósito de gasa poroso y esparadrapo no irritante. Además, la zona tratada se cubrirá de forma que se mantengan colocados el apósito y la sustancia y se impida a los animales la ingestión de esta. Cabe utilizar dispositivos de sujeción para evitar la ingestión de la sustancia objeto de estudio, pero no se recomienda la inmovilización completa.

Al final del período de exposición, se eliminará la sustancia restante, siempre que sea posible, por medio de agua o algún otro método apropiado de limpieza de la piel.

Es preciso observar a diario a todos los animales y registrar los signos de toxicidad, incluidos el momento de comienzo, el grado y la duración. Entre las observaciones que deben practicarse sobre los animales enjaulados destacan las de modificaciones de la piel y el pelo, los ojos y las membranas mucosas, así como de los sistemas respiratorio, circulatorio, autonómico y nervioso central, la actividad somatomotriz y el comportamiento. Cada semana, se determinarán el consumo de alimento y el peso de los animales. Son necesarias observaciones periódicas de los animales para evitar en lo posible la pérdida de alguno por causa de canibalismo, autólisis de tejidos o enjaulamiento erróneo. Al final del período de prueba, se realiza la autopsia a todos los supervivientes de los grupos de tratamiento no satélites. Los animales moribundos se retirarán y someterán a autopsia.

En todos los animales, incluidos los controles, se practican habitualmente los exámenes siguientes:

a) Exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo apropiado equivalente, antes de administrar la sustancia estudiada y al final del estudio, preferiblemente en todos los animales, pero por lo menos en los grupos con dosis altas y de control. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales.

b) Pruebas hematológicas al final del período de estudio: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento eritrocitario, recuento y fórmula leucocitarios, y determinación de la coagulación por pruebas como tiempo de coagulación, tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina o recuento de plaquetas.

▼B

c) Determinaciones bioquímicas clínicas en la sangre al final del período de prueba. Se consideran aspectos de interés en todos los estudios el balance electrolítico, el metabolismo de hidratos de carbono y las funciones hepáticas y renal. En la selección de las pruebas concretas influirán las observaciones sobre el modo de acción de la sustancia. Se sugiere la determinación de los parámetros siguientes: calcio, fósforo, cloruro, sodio, potasio, glucosa en ayunas (con período de ayuno apropiado a cada especie), transaminasas glutamicopirúvica ([1]) y gluamicooxaloacética ([2]) séricas, ornitindescarboxilasa, gammaglutamiltranspeptidasa, nitrógeno ureico, albúmina, creatinina plasmática, bilirrubina total y proteínas séricas totales. Entre otras determinaciones que pueden ser necesarias para una evaluación toxicológica adecuada figuran los análisis de lípidos, hormonas, equilibrio acidobásico, metahemoglobina y actividad de colinesterasa. Siempre que sea preciso, se emplearán otras pruebas bioquímicas clínicas para ampliar la investigación de los efectos observados.

d) El análisis de orina no es necesario de forma sistemática, sino solo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos.

Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración.

Autopsia

Se practicará en todos los animales una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. Hígado, riñones, suprarrenales y testículos deben pesarse frescos lo antes posible tras la disección, a fin de evitar la desecación. Se conservarán en un medio adecuado para un posible examen histopatológico posterior los órganos y tejidos siguientes: todas las lesiones macroscópicas, el cerebro —incluidos cortes de bulbo/protuberancia—, corteza cerebelosa y encefálica, hipófisis, tiroides/paratiroides, tejido tímico, (tráquea), pulmones, corazón, aorta, (glándulas salivales), hígado, bazo, riñones, suprarrenales, páncreas, gónadas, útero, órganos genitales accesorios, vesícula biliar (si existe), esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon, recto, vejiga urinaria, ganglio linfático representativo, (glándula mamaria femenina), (musculatura del muslo), nervio periférico, (ojos), (esternón con médula ósea), (fémur, incluida superficie articular), (médula espinal a tres niveles: cervical, mesotorácico y lumbar) y (glándulas lagrimales exorbitarias). Los tejidos que aparecen entre paréntesis solo se examinarán si así lo aconsejan los signos de toxicidad o afectación del órgano efector.

Examen histopatológico

a) Se someterán a un examen histopatológico completo la piel normal y la tratada, y los órganos y tejidos de los animales de los grupos de control y los de dosis máxima.

b) Se examinarán todas las lesiones macroscópicas.

([1]) Conocida actualmente como alaninaminotransferasa sérica.
([2]) Conocida actualmente como aspartatoaminotransferasa sérica.

▼B

c) Se examinarán los órganos efectores de los animales de grupos con otras dosis.

d) Si se utilizan ratas, se someterán los pulmones de los animales integrantes de los grupos con dosis mínimas e intermedias a examen histopatológico en busca de signos de infección, ya que esta medida permite una evaluación cómoda del estado de salud de los animales. Es posible que en los animales de estos grupos no sean necesarios por sistema exámenes histopatológicos complementarios, pero siempre se llevarán a cabo en los órganos de los del grupo con dosis máxima que presenten indicios de lesiones.

e) Cuando se utilice un grupo satélite, se practicará un examen histopatológico de los tejidos y órganos que presenten signos de toxicidad en los grupos tratados.

2. **RESULTADOS**

Los resultados se resumirán en forma de tabla, y mostrarán para cada grupo de prueba el número de animales al comienzo del ensayo, el de los que presenten lesiones y el porcentaje de animales con cada tipo de lesión. Los resultados se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1. DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá si fuera posible:

— especie, cepa, origen, condiciones ambientales, alimentación,

— condiciones de la prueba,

— dosis (incluido el vehículo, si procede) y concentraciones,

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis,

— dosis carente de efectos, si es posible,

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron a la experiencia,

— descripción de los efectos tóxicos o de otro tipo,

— momento de observación de cada signo anómalo y evolución de este,

— datos sobre alimentación y peso,

— hallazgos oftalmológicos,

— pruebas hematológicas practicadas y sus resultados completos,

— pruebas de bioquímica clínica empleadas y sus resultados completos (incluidos los del análisis de orina, si procede),

— hallazgos de autopsia,

▼B

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos,

— tratamiento estadístico de los resultados, si es posible,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼M4

## B.29. TOXICIDAD SUBCRÓNICA POR INHALACIÓN: ESTUDIO DE 90 DÍAS

RESUMEN

El presente método de ensayo B.29 se ha diseñado para caracterizar debidamente la toxicidad por inhalación de una sustancia química después de una exposición subcrónica (90 días de duración), y para recabar datos robustos que permitan hacer una evaluación cuantitativa del riesgo por inhalación. Se forman lotes de al menos 10 roedores machos y 10 hembras y se exponen 6 horas al día durante un período de 90 días (13 semanas) a: a) la sustancia problema a tres o más niveles de concentración; b) aire filtrado (testigo negativo), y/o c) el vehículo (testigo del vehículo). Habitualmente los animales se exponen 5 días por semana, aunque se acepta una pauta de 7 días por semana. Se estudian siempre animales machos y hembras, pero pueden exponerse a diferentes niveles de concentración si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema. Este método concede al director del estudio suficiente flexibilidad para incluir lotes satélite (reversibilidad), sacrificios durante el ensayo, lavados broncoalveolares (BAL), pruebas neurológicas y otras evaluaciones de patología clínica y de histopatología orientadas a caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema.

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 413 de la OCDE (2009). Las directrices originales sobre ensayos de toxicidad subcrónica por inhalación (TG 413) fueron adoptadas en 1981 (1). El presente método de ensayo B.29 [equivalente a las TG 413 (2009) revisadas] se ha actualizado para reflejar el estado actual de la ciencia y satisfacer las necesidades normativas actuales y futuras.

2. Los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación sirven fundamentalmente para establecer las concentraciones normativas que permitan evaluar el riesgo de los trabajadores en el entorno laboral. Permiten además evaluar el riesgo en la vivienda humana, el transporte y el medio ambiente. Este método permite caracterizar los efectos adversos que se producen después de la exposición por inhalación diaria continuada de una sustancia problema durante 90 días (aproximadamente el 10 % de la vida de la rata). A partir de los datos derivados de los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación, se pueden hacer evaluaciones cuantitativas del riesgo y seleccionar las concentraciones aplicables a los estudios de toxicidad crónica. El presente método de ensayo no está específicamente destinado a la investigación de nanomateriales. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 39 (2).

### CONSIDERACIONES INICIALES

3. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema. En la selección de las concentraciones idóneas de estudio resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro,* uso(s) previsto(s) y posible exposición humana, datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de compuestos químicos estructuralmente afines, y resultados obtenidos en otros estudios de exposición continuada. Si se prevé o se observa neurotoxicidad en el transcurso del estudio, el director del mismo puede decidir la incorporación de las evaluaciones pertinentes, como una batería de observación funcional (FOB) y registros de la actividad motriz. Si bien el calendario de las exposiciones en relación con las evaluaciones concretas puede ser crítico, la realización de estas actividades complementarias no debe interferir en el diseño básico del estudio.

▼M4

4. Las diluciones de sustancias problema corrosivas o irritantes se pueden estudiar a concentraciones capaces de inducir el grado de toxicidad esperado. Se ofrece más información en el documento de orientación nº 39 (2). Al exponer los animales a estos productos, las concentraciones diana deben ser lo bastante bajas para no provocar un dolor y sufrimiento intensos, pero suficientes para obtener una curva de concentración-respuesta que satisfaga los objetivos científicos y normativos del ensayo. Dichas concentraciones se escogerán según cada caso, preferiblemente sobre la base de estudios del intervalo analítico debidamente diseñados que arrojen información sobre el parámetro crítico principal, el eventual umbral de irritación y el tiempo de aparición de los síntomas (véanse los puntos 11-13). Se justificará la elección de las concentraciones.

5. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva. Los animales moribundos se contabilizan como muertes durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

6. Hay que utilizar roedores adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie preferida es la rata. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

**Preparación de los animales**

7. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la asignación aleatoria, los animales serán adultos jóvenes de entre 7 y 9 semanas de edad. Los pesos corporales se desviarán a lo sumo ± 20 % del peso medio de cada sexo. Se seleccionan al azar los animales, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes de iniciar el ensayo, a fin de que se aclimaten a las condiciones del laboratorio.

**Zootecnia**

8. Los animales se identificarán de manera individual, preferiblemente con transpondedores subcutáneos, a fin de facilitar la observación y evitar confusiones. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por lotes de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas, térmicas o de inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. La iluminación será artificial, con una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

▼M4

**Cámaras de inhalación**

9. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzan mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento de orientación nº 39 (2) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

ESTUDIOS DE TOXICIDAD

**Concentraciones límite**

10. A diferencia de los estudios de toxicidad aguda, en los estudios de toxicidad subcrónica por inhalación no hay concentraciones límite definidas. La concentración máxima estudiada dependerá de: 1) la máxima concentración alcanzable, 2) el nivel de exposición humana en el caso más desfavorable, 3) la necesidad de mantener un suministro de oxígeno adecuado, y/o 4) la atención al bienestar de los animales. Si no se dispone de datos de concentración límite, es aplicable el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (13) [hasta una concentración máxima de 5 mg/l para los aerosoles, de 20 mg/l para los vapores y de 20 000 ppm para los gases; véase el documento GD 39 (2)]. Cuando sea preciso superar estos límites en el estudio de gases o sustancias altamente volátiles (por ejemplo, refrigerantes), habrá que justificar los motivos. La concentración límite será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

**Estudio de determinación del intervalo**

11. Antes de proceder al estudio principal, generalmente es necesario realizar un estudio para determinar el intervalo analítico. Un estudio de determinación del intervalo es más completo que un estudio preliminar, por cuanto no se limita a la selección de las concentraciones. La información recabada en este tipo de estudio puede ser decisiva para el éxito del estudio principal. Un estudio de determinación del intervalo puede, por ejemplo, aportar información técnica referente a los métodos analíticos y al tamaño de partícula, la detección de los mecanismos de toxicidad, los datos de patología clínica y de histopatología, y las estimaciones de lo que podrán ser el NOAEL y la concentración tóxica mínima en un estudio principal. El director de la investigación decidirá si basarse en el estudio de determinación del intervalo para identificar el umbral de irritación de las vías respiratorias (con la histopatología de las vías respiratorias, las pruebas de la función pulmonar o el lavado broncoalveolar), la concentración máxima tolerada sin causar un sufrimiento indebido a los animales y los parámetros que caractericen mejor la toxicidad de la sustancia problema.

12. Un estudio de determinación del intervalo puede hacerse con uno o más niveles de concentración. Dependiendo de los parámetros elegidos, a cada nivel de concentración se expondrán de tres a seis machos y de tres a seis hembras. El estudio de determinación del intervalo tendrá una duración mínima de 5 días y máxima (generalmente) de 28 días. En el informe del estudio se justificará la selección de las concentraciones destinadas al estudio principal. La finalidad del estudio principal es demostrar una relación concentración-respuesta basada en lo que se prevé como el parámetro más sensible. La concentración más baja será idealmente una en la que no se observen efectos adversos, mientras que la concentración más alta será tal que induzca una toxicidad inequívoca sin provocar un sufrimiento indebido a los animales ni afectar a su longevidad (3).

▼M4

13. A la hora de elegir los niveles de concentración para el estudio de determinación del intervalo, se tendrá en cuenta toda la información disponible, incluidos las relaciones entre estructura y actividad y los datos de sustancias afines (véase el punto 3). Un estudio de determinación del intervalo puede verificar o refutar los parámetros relacionados con los mecanismos de acción que *a priori* se consideran más sensibles, como la inhibición de la colinesterasa por los organofosforados, la formación de metahemoglobina por agentes eritrotóxicos, las hormonas tiroideas ($T_3$ y $T_4$), en el caso de tirotóxicos, y la presencia de proteínas, LDH o neutrófilos en el lavado broncoalveolar en el caso de partículas inocuas escasamente solubles o de aerosoles que son irritantes pulmonares.

**Estudio principal**

14. El estudio principal de toxicidad subcrónica comprende habitualmente tres niveles de concentración, además de lotes de control negativo (aire) y/o testigo del vehículo (véase el punto 18). Se recurrirá a todos los datos disponibles para basar la selección de los niveles de exposición adecuados, incluidos los resultados de los estudios de toxicidad sistémica, metabólicos y cinéticos (poniendo especial atención para evitar niveles de concentración elevados que saturen los procesos cinéticos). Cada lote de ensayo se compone de 10 roedores machos y de 10 hembras, que se exponen a la sustancia química 6 horas al día en un régimen de 5 días por semana durante un período de 13 semanas (la duración total del estudio es de 90 días como mínimo). También se admite exponer a los animales 7 días por semana (por ejemplo, cuando se estudian productos farmacéuticos para inhalación). Si se sabe que uno de los sexos es más sensible a la sustancia problema, podrán exponerse los dos sexos a diferentes niveles de concentración con el fin de optimizar la relación concentración-respuesta, tal como se describe en el punto 15. Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificarán los motivos cuando el tiempo de exposición sea inferior a 6 horas/día o cuando sea necesario efectuar un estudio de exposición de cuerpo entero de larga duración (por ejemplo, 22 horas/día) [véase el documento GD 39 (2)]. Se privará de comida a los animales durante el período de exposición, a menos que este exceda de 6 horas. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.

15. Las concentraciones diana seleccionadas deben servir para identificar el órgano o los órganos diana y para demostrar una clara relación concentración-respuesta.

— El nivel de concentración más elevado debe inducir efectos tóxicos, pero sin provocar letalidad o daños persistentes que impidan hacer una evaluación significativa.

— El nivel o los niveles de concentración intermedios se espaciarán para obtener una graduación o escala de los efectos tóxicos desde el nivel más bajo al más elevado.

— La concentración más baja debe producir escasos o nulos signos de toxicidad.

**Sacrificios durante el estudio**

16. Si se proyecta hacer sacrificios durante la investigación, el número de animales incluido en cada nivel de exposición se incrementará en el número que vaya a ser sacrificado antes de que concluya el estudio. Se justificará la necesidad de hacer tales sacrificios, que se computarán oportunamente en los análisis estadísticos.

▼M4

**Estudio satélite (de reversibilidad)**

17. Es posible recurrir a un estudio satélite (de reversibilidad) para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de toxicidad durante un período de duración adecuada, pero nunca inferior a 14 días, después del tratamiento. Los lotes satélite (de reversibilidad) se componen de 10 machos y 10 hembras, que se exponen simultáneamente a los animales de experimentación del estudio principal. Los lotes del estudio satélite (de reversibilidad) deben exponerse a la sustancia problema al nivel de concentración más elevado y, en la medida necesaria, se emplearán simultáneamente lotes de control con aire y/o con el vehículo (véase el punto 18).

**Animales de control**

18. Los animales de control negativo (con aire) en paralelo se tratan de manera idéntica a los animales del lote experimental, excepto en que se exponen al aire filtrado en lugar de a la sustancia problema. Cuando se utiliza agua o cualquier otra sustancia para ayudar a crear la atmósfera experimental, en el estudio debe incluirse un lote testigo del vehículo, en lugar del lote de control negativo (con aire). Como vehículo se usará agua en la medida de lo posible. Cuando se use agua como vehículo, los animales de control se expondrán a una atmósfera de aire con la misma humedad relativa que los grupos expuestos a la sustancia problema. La selección de un vehículo idóneo se basará en un ensayo preliminar debidamente realizado o bien en los datos previos. Cuando no se conoce bien la toxicidad de un vehículo, el director del estudio puede decidir el uso de ambos grupos, el de control negativo (con aire) y el testigo del vehículo, pero no es en absoluto recomendable. Si los datos previos revelan que un vehículo es atóxico, no hay necesidad de emplear un grupo de control negativo (con aire), y solo se usará un lote testigo del vehículo. Si un ensayo preliminar de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada y es el que debe utilizarse como control.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

**Administración de las concentraciones**

19. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. El estado físico investigado dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de las concentraciones seleccionadas y/o de la forma física más probable que adoptará la sustancia química durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas. Las materias particuladas pueden someterse a procesos mecánicos para reducir el tamaño de partícula. Se ofrecen más orientaciones en el documento de orientación nº 39 (2).

**Distribución granulométrica**

20. Se controlará el tamaño de partícula en todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 3 μm, con una desviación típica geométrica ($\sigma_g$) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (4). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Así, por ejemplo, las partículas de los humos metálicos tienen un tamaño inferior al mencionado intervalo, mientras que las partículas con carga y las fibras pueden superarlo.

▼M4

**Preparación de la sustancia problema en un vehículo**

21. En condiciones ideales, la sustancia problema debería estudiarse sin ningún vehículo. Si es necesario emplear un vehículo para generar una concentración de sustancia problema y un tamaño de partícula adecuados, se le dará preferencia al agua. Siempre que una sustancia problema se disuelva en un vehículo, debe demostrarse su estabilidad.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

**Caudal de aire de la cámara**

22. El caudal de aire de la cámara de exposición se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión en tiempo real de la concentración atmosférica (o la estabilidad temporal) del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de la inhalación que resultan de interés. Si la concentración se supervisa en tiempo real, es posible reducir la frecuencia de medición del caudal de aire limitándola a una sola medición por exposición y día. Habrá que tomar especiales precauciones para evitar la reinspiración en las cámaras de solo por la nariz. La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no se van a conseguir estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases. Si las mediciones del primer día de exposición revelan que estos gases están presentes a las concentraciones adecuadas, no serán necesarias nuevas determinaciones.

**Temperatura y humedad relativa de la cámara**

23. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. Siempre que sea posible, la humedad relativa presente en la zona de respiración de los animales, tanto en las exposiciones de solo por la nariz como de cuerpo entero, se supervisará de manera continua y se registrará cada hora durante la exposición. La humedad relativa debe mantenerse preferiblemente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia con el método de ensayo).

**Sustancia problema: concentración nominal**

24. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara de inhalación. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

**Sustancia problema: concentración real**

25. La concentración real es la concentración de sustancia problema comprobada por muestreo en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia problema. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también

▼M4

por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trata de productos en forma de aerosol capaces de evaporarse o sublimarse, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases.

26. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema a lo largo de todo el estudio, lote que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

27. La atmósfera de exposición debe mantenerse constante en la medida de lo posible. Para demostrar la estabilidad de las condiciones de exposición se puede usar un equipo de supervisión en tiempo real, como un fotómetro de proceso para aerosoles o un analizador de hidrocarburos totales para análisis de vapores. La concentración real presente en la cámara deberá medirse al menos 3 veces por cada nivel y día de exposición. Pero si ello no es posible debido a un caudal de aire limitado o a que las concentraciones son bajas, se acepta una muestra por período de exposición. En ese caso, lo ideal es recoger la muestra durante todo el período de exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en más de un ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, ni en más de un ± 20 % en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y documentará el tiempo de equilibrado ($t_{95}$) de la cámara. La duración de una exposición incluye el tiempo durante el cual se genera la sustancia problema. Este abarca los tiempos transcurridos hasta alcanzar el equilibrio en la cámara ($t_{95}$) y hasta la extinción. Se ofrecen indicaciones para el cálculo de $t_{95}$ en el documento de orientación nº 39 (2).

28. Cuando se manejan mezclas muy complejas formadas por gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación. Por consiguiente, se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente el componente activo principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o el componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (2).

**Sustancia problema: distribución granulométrica**

29. La distribución granulométrica de los aerosoles debe determinarse al menos con periodicidad semanal por cada nivel de concentración, con ayuda de un impactador de cascada o un aparato alternativo, como un medidor del tamaño aerodinámico de partícula (APS). Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio.

▼M4

30. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (2)]. Si es posible demostrar su equivalencia para todas las concentraciones analizadas en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir el ensayo.

31. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases.

OBSERVACIONES

32. Los animales se someterán a observación clínica frecuente antes, durante y después del período de exposición. Pueden estar indicadas observaciones más frecuentes, dependiendo de la respuesta de los animales durante la exposición. Cuando la observación de los animales esté dificultada por el uso de tubos de sujeción, por la escasa iluminación de las cámaras de cuerpo entero o por la opacidad ambiental, se someterán a observación minuciosa después de la exposición. Las observaciones realizadas con anterioridad a la exposición del día siguiente permiten determinar la posible reversibilidad o exacerbación de los efectos tóxicos.

33. Todas las observaciones se registrarán en fichas individuales de cada animal. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

34. Las observaciones fuera de la jaula deberían incluir los cambios en la piel, pelo, ojos y membranas mucosas; los cambios en los sistemas respiratorio, circulatorio y nervioso, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento. En el protocolo del estudio se pueden incluir otras evaluaciones del tipo de pruebas cinéticas, biovigilancia, pruebas de la función pulmonar, retención de materiales escasamente solubles que puedan acumularse en el tejido pulmonar y cambios comportamentales.

PESO CORPORAL

35. Se registrará el peso de cada animal poco antes de la primera exposición (día 0), y después dos veces por semana (por ejemplo, los viernes y lunes para demostrar la recuperación durante un fin de semana sin exposición, o con un intervalo que permita evaluar la toxicidad sistémica) y en el momento de la muerte o la eutanasia. Si no se observan efectos en las 4 primeras semanas, el peso corporal se podrá registrar semanalmente durante el resto del estudio. Si se utilizan animales satélite (reversibilidad), se seguirán pesando semanalmente durante todo el período de recuperación. Al concluir el estudio, se pesarán todos los animales poco antes del sacrificio para permitir calcular sin sesgos la relación entre el peso de los órganos y el peso corporal.

CONSUMO DE AGUA Y DE ALIMENTOS

36. El consumo alimentario se medirá cada semana. También se puede medir el consumo de agua.

▼M4

PATOLOGÍA CLÍNICA

37. Deben hacerse evaluaciones de patología clínica en todos los animales, incluidos los testigo y los satélite (reversibilidad), cuando sean sacrificados. Se registrará el intervalo de tiempo transcurrido entre el final de la exposición y la toma de muestras de sangre, particularmente si la recuperación del parámetro valorado es rápida. Está indicado obtener muestras al final del período de exposición cuando se trata de parámetros con una semivida plasmática corta (por ejemplo, COHb, CHE y MetHb).

38. En el cuadro 1 se recogen los parámetros de patología clínica que se suelen exigir en todos los estudios toxicológicos. El análisis de orina no es necesario hacerlo de forma sistemática, sino solo en caso de efectos tóxicos probables o manifiestos. El director del estudio puede decidir la evaluación de otros parámetros para caracterizar mejor la toxicidad de una sustancia problema (colinesterasa, lípidos, hormonas, equilibrio ácido-base, metahemoglobina o cuerpos de Heinz, creatina-cinasa, cociente mieloide/eritroide, troponinas, gases en sangre arterial, lactato-deshidrogenasa, sorbitol-deshidrogenasa, glutamato-deshidrogenasa y gamma-glutamil-transpeptidasa).

*Cuadro 1*

**Parámetros de patología clínica habituales**

| Hematología | |
|---|---|
| Recuento de eritrocitos | Recuento de leucocitos |
| Hematocrito | Fórmula leucocitaria |
| Concentración de hemoglobina | Recuento de plaquetas |
| Hemoglobina corpuscular media | Capacidad de coagulación (seleccionar una): |
| Volumen corpuscular medio | — Tiempo de protrombina |
| Concentración de hemoglobina corpuscular media | — Tiempo de coagulación |
| Reticulocitos | — Tiempo de tromboplastina parcial |
| **Bioquímica clínica** | |
| Glucosa (*) | Alanina-aminotransferasa |
| Colesterol total | Aspartato-aminotransferasa |
| Triglicéridos | Fosfatasa alcalina |
| Nitrógeno ureico en sangre | Potasio |
| Bilirrubina total | Sodio |
| Creatinina | Calcio |
| Proteínas totales | Fósforo |
| Albúmina | Cloruros |
| Globulinas | |
| **Análisis de orina (opcional)** | |
| Aspecto (color y turbidez) | Proteínas totales |
| Volumen | Glucosa |
| Densidad y osmolalidad | Sangre/células sanguíneas |
| pH | |

(*) Puesto que un período de ayuno prolongado puede introducir un sesgo en las determinaciones de glucosa entre los animales testigo y los tratados, el director del estudio decidirá si es apropiado o no imponer dicho ayuno a los animales. Si se impone un período de ayuno, será acorde a la especie empleada; para las ratas puede ser de 16 horas (ayuno desde la víspera). La determinación de la glucosa en ayunas puede hacerse previo ayuno desde la víspera durante la última semana de exposición, o bien previo ayuno desde la víspera antes de proceder a la autopsia (en este último caso, con la determinación de los restantes parámetros de patología clínica).

▼M4

39. Cuando hay indicios de que las vías respiratorias bajas (alvéolos) son el lugar principal de depósito y retención, el lavado broncoalveolar (BAL) puede ser la técnica de elección para analizar cuantitativamente los parámetros hipotéticamente dependientes de la dosis relacionados con la aparición de alveolitis, inflamación pulmonar y fosfolipidosis. Ello permite demostrar debidamente la relación dosis-respuesta y la evolución en el tiempo del daño alveolar. En el fluido BAL se pueden analizar el recuento de leucocitos y la fórmula leucocitaria, las proteínas totales y la lactato-deshidrogenasa. Otros parámetros dignos de tenerse en cuenta son los indicadores de daño lisosomal, fosfolipidosis, fibrosis e inflamación alérgica o irritativa, como puede ser la determinación de las citocinas o quimiocinas proinflamatorias. Generalmente, las determinaciones realizadas en el BAL son complementarias de los resultados del examen histopatológico, pero no pueden sustituirlos. En el documento GD 39 (2) se facilitan indicaciones sobre el modo de realizar un lavado pulmonar.

EXAMEN OFTALMOLÓGICO

40. Con ayuda de un oftalmoscopio o instrumento equivalente, se realizarán exploraciones oftalmológicas del fondo de ojo, los medios refringentes, el iris y la conjuntiva de todos los animales antes de la administración de la sustancia problema, y del grupo sometido a concentración más elevada al concluir el estudio. Si se apreciaran alteraciones oculares, se examinará a todos los animales, incluidos los del lote satélite (de reversibilidad).

ANATOMÍA PATOLÓGICA MACROSCÓPICA Y PESO DE LOS ÓRGANOS

41. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Se documentará el tiempo transcurrido entre el final de la última exposición de cada animal y su sacrificio. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de descubrir la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a una temperatura suficientemente baja para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.

42. En el cuadro 2 se indican los órganos y tejidos que durante la autopsia macroscópica deben conservarse en un medio idóneo para su examen histopatológico. La conservación de los órganos y tejidos entre corchetes, así como de cualquier otro órgano o tejido, se hará a criterio del director del estudio. Los órganos destacados **en negrita** se deben limpiar de adherencias y pesar lo antes posible después de la disección para evitar su desecación. El tiroides y los epidídimos solo se pesarán en caso necesario, porque los artefactos debidos a las adherencias pueden dificultar la evaluación histopatológica. Los tejidos y órganos se fijan en formol con amortiguador al 10 % o en otro fijador apropiado inmediatamente después de la autopsia, dejando pasar un mínimo de 24-48 horas antes de la limpieza de adherencias, dependiendo del fijador empleado.

▼M4

*Cuadro 2*

**Órganos y tejidos conservados durante la autopsia macroscópica**

| | |
|---|---|
| **Cápsulas suprarrenales** | Esófago |
| Aorta | [Bulbo olfativo] |
| Médula ósea (y/o aspirado reciente) | **Ovarios** |
| **Encéfalo** (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia) | Páncreas |
| Intestino ciego | Glándulas paratiroides |
| Colon | Nervios periféricos (ciático o tibial, preferiblemente próximos al músculo) |
| Duodeno | Hipófisis |
| [**Epidídimos**] | Próstata |
| [Ojos (retina, nervio óptico) y párpados] | Recto |
| Fémur y articulación tibiofemoral | Glándulas salivales |
| Vesícula biliar (de estar presente) | Vesículas seminales |
| [Glándula de Harder] | Piel |
| **Corazón** | Médula espinal (cervical, medio-dorsal y lumbar) |
| Íleo | **Bazo** |
| Yeyuno | Esternón |
| **Riñones** | Estómago |
| [Glándulas lacrimales (extraorbitarias)] | Dientes |
| Laringe (3 secciones, incluida la base de la epiglotis) | **Testículos** |
| **Hígado** | **Timo** |
| **Pulmón** (todos los lóbulos en una sección de corte, incluidos los bronquios primarios) | **Glándula tiroides** |
| Ganglios linfáticos de la región hiliar del pulmón, especialmente cuando se estudian sustancias problema particuladas escasamente solubles. Si se trata de exámenes más minuciosos o de carácter inmunológico, pueden tomarse en consideración otros ganglios linfáticos, por ejemplo de las regiones mediastínica, cervical/submandibular o auricular. | [Lengua] |
| | Tráquea (como mínimo 2 secciones, 1 longitudinal que pase por la carina traqueal y 1 sección transversal) |
| Ganglios linfáticos (distales de la vía de acceso) | [Uréteres] |
| Glándulas mamarias (femeninas) | [Uretra] |
| Músculo (muslo) | [Vejiga urinaria] |
| Tejidos nasofaríngeos [como mínimo 4 secciones; una sección incluirá el conducto nasofaríngeo y el tejido linfoide asociado a la nariz (Nasal Associated Lymphoid Tissue, NALT)] | **Útero** |
| | Órganos diana |
| | Todas las masas y lesiones macroscópicas |

▼M4

43. El pulmón se debe extraer intacto, pesar e instilar con un fijador apropiado a una presión de 20-30 cm de agua para asegurar el mantenimiento de la estructura pulmonar (5). Se preparan cortes de todos los lóbulos a un solo nivel, incluyendo los bronquios primarios, pero, si se practica un lavado pulmonar, el lóbulo no lavado se seccionará a tres niveles (no en cortes seriados).

44. Deben examinarse como mínimo 4 secciones de los tejidos nasofaríngeos, una de las cuales incluirá el conducto nasofaríngeo (5) (6) (7) (8) (9) para permitir una observación adecuada de los epitelios escamoso, transicional (respiratorio no ciliado) y olfativo, y el tejido de drenaje linfático (NALT) (10) (11). Se examinarán tres secciones de la laringe, una de las cuales debe incluir la base de la epiglotis (12). Deben examinarse como mínimo 2 secciones de la tráquea, entre ellas un corte longitudinal que pase por la carina de bifurcación de los bronquios extrapulmonares y un corte transversal.

EXAMEN HISTOPATOLÓGICO

45. La evaluación histopatológica de todos los órganos y tejidos mencionados en el cuadro 2 se llevará a cabo en el lote de control y en el de concentración más elevada, así como en todos los animales que mueran o sean sacrificados durante el estudio. Se prestará especial atención a las vías respiratorias, los órganos diana y las lesiones macroscópicas. Aquellos órganos y tejidos que presenten lesiones en el lote de concentración más elevada se examinarán en todos los grupos. Con objeto de demostrar una clara relación concentración-respuesta, el director del estudio puede decidir la realización de evaluaciones histopatológicas en otros lotes. Si se utiliza un lote satélite (reversibilidad), debe hacerse un examen histopatológico de todos los órganos y tejidos que presenten efectos en los lotes tratados. Si en el lote de exposición elevada se producen muertes prematuras u otras dificultades que comprometan la interpretación de los datos, se practicarán evaluaciones histopatológicas en el lote de la concentración inmediatamente inferior. Se procurará correlacionar las observaciones macroscópicas con los hallazgos microscópicos.

DATOS E INFORME

**Datos**

46. Se documentarán los datos de cada animal referentes a peso corporal, consumo de alimento, patología clínica, anatomía patológica macroscópica, peso de los órganos e histopatología. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y la reversibilidad, y los resultados de la autopsia. Todos los resultados, cuantitativos y fortuitos, se evaluarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido; los métodos estadísticos aplicados deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

**Informe del ensayo**

47. El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

*Animales de experimentación y zootecnia*

— Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.

▼M4

— Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata. Podrán indicarse la procedencia y los datos previos, siempre que correspondan a animales sometidos a condiciones parecidas de exposición, alojamiento y alimentación.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Método de asignación al azar.

— Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

*Sustancia problema*

— Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).

— Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

*Vehículo*

— Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).

— Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

*Cámara de inhalación*

— Descripción pormenorizada de la cámara de inhalación, incluido el volumen, y acompañada de un diagrama.

— Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.

— Instrumental empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

— Fuente del aire y sistema de acondicionamiento.

— Métodos de calibración del instrumental para garantizar una atmósfera experimental homogénea.

— Diferencia de presión (positiva o negativa).

— Puertos de exposición por cámara (solo por la nariz); ubicación de los animales en la cámara (de cuerpo entero).

— Estabilidad de la atmósfera experimental.

— Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.

— Tratamiento del aire suministrado/extraído.

— Caudales de aire, caudal de aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).

— Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ($t_{95}$) en la cámara de inhalación.

— Número de variaciones de volumen por hora.

— Dispositivos de dosificación (si procede).

*Datos relativos a la exposición*

— Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.

▼**M4**

— Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).

— Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.

— Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, $mg/m^3$, etc.) y no en unidades de volumen (ppm, ppmm, etc.).

— Distribución granulométrica, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica ($\sigma_g$), incluidos los correspondientes métodos de cálculo. Se documentarán los análisis granulométricos individuales.

*Condiciones del ensayo*

— Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema.

— Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.

— Descripción pormenorizada del instrumental empleado para controlar la temperatura, la humedad y el caudal de aire de la cámara (creación de una curva de calibración).

— Descripción pormenorizada del equipo empleado para tomar las muestras con el fin de medir la concentración de la cámara y la distribución por tamaño de partícula.

— Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

— Método aleatorio de asignación de los animales a los lotes de exposición y de control (testigo).

— Pormenores de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua.

— Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

*Resultados*

— Tabulación de los valores de temperatura, humedad y caudal de aire de la cámara.

— Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

— Tabulación de los datos de granulometría, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y $\sigma_g$.

— Tabulación de las respuestas y de los niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad, momento de aparición y duración de los efectos).

▼M4

— Tabulación de los pesos de los animales individuales.

— Tabulación del consumo de alimentos.

— Tabulación de los datos de patología clínica.

— Resultados de la autopsia y eventuales observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

*Evaluación e interpretación de los resultados*

— Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para satisfacer los criterios del presente método de ensayo como, por ejemplo, la concentración límite o el tamaño de partícula.

— Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplienlos criterios relativos al tamaño de partícula.

— En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.

— Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

— Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre parámetros de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (3).

— Se identificarán el órgano o los órganos diana.

— Se determinarán los valores de NOAEL y LOAEL.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(4) Whalan E and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

(5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229-258.

(6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309-312.

(7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231-238.

▼**M4**

(8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215-263.

(9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353-372.

(10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hameleers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219-224.

(11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140-141: 281-285.

(12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419-428.

(13) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el Reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

*Apéndice 1*

DEFINICIÓN

**Sustancia problema:** cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼M4

## B.30. ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 452 de la OCDE (2009). Las TG 452 originales fueron adoptadas en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.30 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (1) (2) (3) (4). La actualización de este método de ensayo B.30 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.32. Ensayo de carcinogénesis y B.33. Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, con el fin de obtener más información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. El presente método de ensayo ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales.

2. La mayoría de los ensayos de toxicidad crónica se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (5), con las debidas modificaciones, tal como se especifica en el documento de orientación nº 116 de la OCDE sobre diseño y realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (6).

3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de toxicidad crónica son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6).

4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de toxicidad crónica. Si bien los estudios de toxicidad crónica a largo plazo que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, parámetros clínicos e histopatológicos, etc. La OCDE dispone de documentación de orientación sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (6) (7) y por vía cutánea (6). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplen la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (7). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (10) del presente anexo.

▼M4

5. Un ensayo de toxicidad crónica proporciona información sobre el peligro para la salud que supone la exposición continuada de la especie estudiada durante una parte considerable de su ciclo vital. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema; indica los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede proporcionar además una estimación del nivel máximo sin efectos adversos observados, que puede ser útil para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.

6. Los objetivos de los estudios realizados según este método de ensayo son:

— la identificación de la toxicidad crónica de una sustancia problema,

— la identificación de los órganos diana,

— la caracterización de la relación dosis-respuesta,

— la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),

— la predicción de los efectos de toxicidad crónica que se producirán a los niveles de exposición humana,

— la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (6).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación de las características toxicológicas de una sustancia problema, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia química antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en la toxicidad crónica potencial y minimizar el uso de animales. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; cualquier información referente al mecanismo de acción; los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo;* el uso o los usos previstos y la exposición humana potencial; los datos de (Q)SAR previos y los datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines; los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y los datos derivados de otros estudios de exposición continuada. La determinación de la toxicidad crónica solo debe emprenderse una vez que se ha recabado la información toxicológica inicial en los ensayos de toxicidad por administración repetida durante 28 días y/o 90 días. Se hará un planteamiento escalonado de los estudios de toxicidad crónica como parte de la evaluación global de los potenciales efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (11) (12) (13) (14).

8. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Una cuestión importante es si la evaluación estadística debe incorporar ajustes de la supervivencia y los análisis en caso de terminación prematura de uno o varios lotes. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y referencias a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (6) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (15).

▼M4

9. Cuando se efectúa un estudio de toxicidad crónica, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de los signos clínicos con criterios compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (16), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o sufrimiento, o reducir la dosis experimental.

10. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (6) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (17) (18). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo o los objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los peligros, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y su importancia, por otro. Ello tiene especial trascendencia cuando se proyecta (punto 11) un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 del presente anexo).

11. Se considerará la posibilidad de efectuar un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (presente método de ensayo B.30) y un ensayo de carcinogénesis (capítulo B.32 de este anexo). El ensayo combinado permite una mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 9 y 20-25) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados.

12. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento GD 116 (6).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

13. La sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas a varios lotes de animales experimentales, normalmente durante un período de 12 meses, si bien este puede reducirse o prolongarse en función de los requisitos normativos (véase el punto 33). Dicho período se ha seleccionado por ser suficientemente largo para permitir que se manifiesten los eventuales efectos de toxicidad acumulativa, pero sin que se confundan con las alteraciones geriátricas. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. La sustancia problema se administra generalmente por vía oral, aunque también se aceptan las vías inhalatoria y cutánea. El diseño del estudio puede contemplar el sacrificio de uno o más animales durante el ensayo, por ejemplo a los 3 y a los 6 meses, y a tal efecto se podrán prever lotes complementarios de animales (véase el punto 19). A lo largo del período de administración, se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

▼M4

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

14. El presente método de ensayo se destina principalmente a la evaluación de la toxicidad crónica en roedores (véase el punto 2), si bien se acepta que en determinados marcos legislativos puedan hacerse estudios parecidos en especies no roedoras. Se justificará la elección de la especie. El diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica en especies no roedoras, cuando proceda, se basará en los principios que se recogen en el presente método de ensayo y en el capítulo B.27 de este anexo, Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en no roedores (5). Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6).

15. La especie recomendada en este método de ensayo es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomopatología. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. El estudio de toxicidad crónica debe efectuarse en animales de la misma variedad y procedencia que los usados en el estudio o los estudios preliminares de toxicidad de más breve duración. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

**Condiciones de alojamiento y alimentación**

16. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (19) (20) (21). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará en el informe final. Así mismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia problema se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de la sustancia problema y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

**Preparación de los animales**

17. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los, animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el

▼M4

estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Después de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, con el que se marca de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio adecuado.

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

18. Se emplearán animales de ambos sexos. Se empleará un número de individuos tal que al concluir el estudio queden suficientes animales en cada grupo para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. Tratándose de roedores, se emplean al menos 20 animales por sexo y lote en cada nivel de dosificación, mientras que en el caso de no roedores se recomienda un mínimo de 4 animales por sexo y lote. En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales en cada grupo de dosificación para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias.

**Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela**

19. Si está científicamente justificado, se podrán hacer provisiones para el sacrificio de animales (como mínimo 10 por sexo y lote) durante el ensayo, por ejemplo a los 6 meses, a fin de obtener información sobre la progresión de las alteraciones toxicológicas y sobre el mecanismo de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración repetida realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Cabe la posibilidad de incluir lotes satélite para controlar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema; generalmente, se limitan al lote del nivel de dosis más elevado del estudio y al lote testigo. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar su estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (22). Si está previsto el sacrificio de animales durante el ensayo o la inclusión de lotes satélite o centinela, el diseño experimental se incrementará en el número de animales que vaya a ser sacrificado antes de que concluya el estudio. Estos animales se someten generalmente a las mismas observaciones (peso corporal, consumo de agua y alimentos, valoraciones de hematología y bioquímica clínica e investigaciones anatomopatológicas) que los animales observados en la fase de toxicidad crónica del estudio principal, aunque se puede establecer que en los lotes que se sacrifiquen durante el ensayo, se restrinja dicha evaluación a aspectos cruciales como la neurotoxicidad o la inmunotoxicidad.

**Grupos de dosis y posología**

20. Se ofrecen indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis en el documento de orientación nº 116 (6). Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control, salvo si se lleva a cabo un ensayo límite (véase el punto 27). Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.

▼M4

21. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Tomando en consideración los factores que se indican en el punto 22 que sigue, el nivel de dosis más elevado será tal que provoque signos de toxicidad, por ejemplo, manifestada por una merma de la ganancia de peso corporal (aproximadamente el 10 %).

22. Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal. La dosis más elevada no debe exceder de 1 000 mg/kg peso corporal/día (dosis límite, véase el punto 27).

23. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 25). Para establecer las dosis más bajas se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja.

24. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de las características de la sustancia problema y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.

25. Tal como se recoge en el documento de orientación nº 116 (6), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:

— los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la relación dosis-respuesta,

— la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre la dosimetría externa e interna,

— las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,

— aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,

— aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,

— los niveles de exposición humana que cabe prever.

▼M4

26. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.

27. Si sobre la base de los estudios preliminares es posible prever que, en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto adverso observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. Se puede establecer un límite de 1 000 mg/kg peso corporal/día, salvo si la exposición humana previsible indica la necesidad de emplear un nivel de dosis más elevado.

**Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema**

28. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (6). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable de que la exposición humana a la sustancia química se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio, como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.

29. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.

30. Si la sustancia problema se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administra con los alimentos, se puede usar una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.

▼M4

31. En el caso de la administración oral, las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales (siete días por semana), en general por un período de 12 meses (véase también el punto 33), si bien los requisitos normativos pueden imponer una duración mayor. Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (10), durante un período de 12 meses. La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición será habitualmente de 12 meses. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (8).

32. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia problema es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (22). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo gastrointestinal.

**Duración del estudio**

33. Si bien este método de ensayo ha sido diseñado principalmente como estudio de toxicidad crónica durante 12 meses, su diseño permite aplicarlo a ensayos de duración menor (6 o 9 meses) o mayor (18 o 24 meses), en función de los requisitos normativos particulares o de los mecanismos específicos que se pretenda investigar. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. Concluida la exposición, los lotes satélite incluidos para comprobar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema deben mantenerse sin administración durante un período no inferior a 4 semanas ni superior a un tercio de la duración total del estudio. Se ofrecen más indicaciones, entre otras, sobre la supervivencia en el estudio en el documento de orientación nº 116 (6).

OBSERVACIONES

34. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda.

▼M4

35. Se someterán todos los animales a observación clínica exhaustiva como mínimo antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto), al concluir la primera semana de estudio y, en lo sucesivo, con periodicidad mensual. El protocolo de tales observaciones se organizará con el fin de minimizar las variaciones entre los observadores individuales y entre los distintos lotes experimentales. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (24).

36. Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado a todos los animales antes de administrar la sustancia problema. Al concluir el estudio, el mismo examen se practicará preferiblemente a todos los animales y, obligatoriamente, a los lotes de control y de dosis más elevada. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás. Si el análisis estructural o cualquier otra información indica toxicidad oftálmica, se aumentará la frecuencia de las exploraciones oftalmológicas.

37. Cuando se trate de sustancias para las que estudios previos de toxicidad por administración repetida durante 28 días o 90 días hayan demostrado efectos neurotóxicos, las pruebas de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (24) [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (25) (26) (27)], así como la evaluación de la fuerza prensil (28) y de la actividad motriz (29), podrán hacerse facultativamente antes de iniciar el estudio, a intervalos de 3 meses durante el mismo hasta un máximo de 12 meses inclusive, y a la conclusión del estudio (si dura más de 12 meses). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

38. Cuando los estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días indiquen que la sustancia tiene capacidad inmunotóxica, al concluir el estudio se podrán proseguir las investigaciones de este parámetro.

**Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria**

39. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán la ingesta de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

▼M4

**Hematología y bioquímica clínica**

40. En las investigaciones realizadas con roedores, se practicarán exámenes hematológicos como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, siempre los mismos, a los 3, 6 y 12 meses y al concluir el estudio (si dura más de 12 meses). En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales satélite para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias (véase el punto 18). Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras más pequeñas de animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros hematológicos en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia.

41. Se investigarán los siguientes parámetros (30): recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de eritrocitos y de plaquetas, concentración de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada. Pueden determinarse además otros parámetros hematológicos como los cuerpos de Heinz, la morfología de otros eritrocitos atípicos o los valores de metahemoglobina, en función de la toxicidad de la sustancia problema. El planteamiento general ha de ser flexible, y adaptado a los efectos observados o esperados de la sustancia problema. Si esta ejerce efectos sobre el sistema hematopoyético, pueden estar indicados recuentos de reticulocitos y una citología de la médula ósea, que no son valoraciones habituales.

42. En los intervalos de tiempo especificados para determinar las variables hematológicas, se realizarán análisis de bioquímica clínica para investigar los principales efectos tóxicos sobre los tejidos y, específicamente, sobre los riñones y el hígado como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, siempre los mismos. En el caso de los ratones, pueden hacer falta animales satélite para efectuar todas las valoraciones necesarias de bioquímica clínica. Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras de menos animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros de bioquímica clínica en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Se recomienda que los animales (a excepción de los ratones) guarden ayuno desde el día anterior a la extracción de las muestras de sangre. Se investigarán los siguientes parámetros (30): glucosa, urea (nitrógeno ureico), creatinina, proteínas totales, albúmina, calcio, sodio, potasio, colesterol total, al menos dos pruebas completas de la función hepatocelular (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, glutamato-deshidrogenasa, ácidos biliares totales) (31) y al menos dos pruebas completas de la función hepatobiliar (fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltransferasa, 5'-nucleotidasa, bilirrubina total, ácidos biliares totales) (31). Cuando proceda y a tenor de la toxicidad de la sustancia problema, pueden hacerse otras valoraciones de bioquímica clínica como las de triglicéridos en ayunas, hormonas específicas y colinesterasa. Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de los efectos observados o esperados con una sustancia química determinada.

▼M4

43. Se practicarán análisis de orina como mínimo en 10 machos y 10 hembras de cada grupo, sobre muestras recogidas respetando los mismos intervalos que en los análisis de hematología y bioquímica clínica. Las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los análisis de orina en un estudio previo efectuado durante 90 días con dosis afines. Las recomendaciones hechas por expertos acerca de los estudios de patología clínica incluyen los siguientes parámetros (30): aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas totales y glucosa. Otras valoraciones son cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y sangre oculta. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.

44. De manera general, se acepta que es necesario disponer de valores basales de hematología y bioquímica clínica antes de someter a estudio a los perros, pero no en el caso de las especies roedoras (30). Ahora bien, si los datos basales históricos (véase el punto 50) son insuficientes, se considerará la oportunidad de generar estos datos.

**Anatomía patológica**

*Autopsia macroscópica*

45. Como norma debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. Sin embargo, se puede prever además la realización solo (en lotes satélite o animales sacrificados durante el ensayo) de valoraciones clave específicas, por ejemplo de neurotoxicidad o inmunotoxicidad (véase el punto 19). Estos animales no tienen que someterse a autopsia ni a las consiguientes exploraciones que se describen a continuación. La autopsia de los animales centinela se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio.

46. Se registrará el peso de los órganos de todos los animales, salvo los que quedan excluidos en la última parte del punto 45. Las cápsulas suprarrenales, encéfalo, epidídimo, corazón, riñones, hígado, ovarios, bazo, testículos, tiroides (que se pesará después de la fijación, con las paratiroides) y útero de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y se determinará el peso húmedo lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. En los estudios con ratones, el pesaje de las cápsulas suprarrenales es opcional.

47. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (32) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Todas las lesiones macroscópicas | Corazón | Páncreas | Estómago (rumen, estómago glandular) |
| Glándulas suprarrenales | Íleo | Glándulas paratiroides | [Dientes] |
| Aorta | Yeyuno | Nervios periféricos | Testículos |
| Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia) | Riñón | Hipófisis | Timo |
| Intestino ciego | Glándulas lacrimales (extraorbitales) | Próstata | Tiroides |
| Cuello del útero | Hígado | Recto | [Lengua] |

▼M4

| | | | |
|---|---|---|---|
| Glándulas coagulantes | Pulmón | Glándulas salivales | Tráquea |
| Colon | Ganglios linfáticos (superficiales y profundos) | Vesículas seminales | Vejiga urinaria |
| Duodeno | Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin son visiblemente diseccionables, también las masculinas) | Músculo esquelético | Útero (y cuello) |
| Epidídimo | [Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales] | Piel | [Uréteres] |
| Ojos (y retina) | Esófago | Médula espinal (tres secciones: cervical, medio-dorsal y lumbar) | [Uretra] |
| [Fémur y articulación tibiofemoral] | [Bulbo olfativo] | Bazo | Vagina |
| Vesícula biliar (en especies distintas de la rata) | Ovarios | [Esternón] | Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula |
| Glándula de Harder | | | |

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se conservarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

*Examen histopatológico*

48. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (32). Como mínimo, el examen histopatológico debe hacerse sobre:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

— todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,

— todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas,

— los tejidos diana (o los tejidos que presentaban alteraciones relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis máxima) de todos los animales pertenecientes a los restantes grupos de dosis,

— en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

▼M4

DATOS E INFORME

**Datos**

49. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.

50. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales controles del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines, y haberse generado en los cincos años precedentes al estudio en cuestión.

51. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 8). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.

**Informe del ensayo**

52. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

— Datos de identificación.

— Procedencia de la sustancia.

— Número de lote.

— Certificado de análisis químico.

*Vehículo (si procede):*

— Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

*Animales de ensayo:*

— Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.

— Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.

▼**M4**

— Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— Peso de cada animal al inicio del ensayo.

*Condiciones del ensayo:*

— Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.

— Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.

— Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.

— Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.

— Vía y método de administración de la sustancia problema.

— En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.

— Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.

— Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

*Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal):*

— Datos de supervivencia.

— Peso corporal y variaciones del mismo.

— Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingesta de agua cuando proceda.

— Datos de respuestas tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad.

— Naturaleza, incidencia (y, si se ha clasificado, gravedad) y duración de las observaciones clínicas (reversibles o no).

— Examen oftalmológico.

— Pruebas hematológicas.

— Análisis de bioquímica clínica.

— Análisis de orina.

— Resultados de cualesquiera investigaciones de neurotoxicidad o inmunotoxicidad.

— Peso corporal en el momento de la muerte.

— Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).

— Observaciones de la autopsia.

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento.

— Datos sobre la absorción, si los hay.

▼M4

*Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.*

*La discusión de los resultados comprende lo siguiente:*

— La relación dosis-respuesta.

— Otras informaciones sobre el modo de acción.

— La discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.

— Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.

— Datos sobre controles históricos.

— Relevancia para los seres humanos.

*Conclusiones*

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145-191.

(4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

(5) Capítulo B.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores.

(6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment N$^{o}$ 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(8) Capítulo B.8 del presente anexo. Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.

(9) Capítulo B.29 del presente anexo. Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.

(10) Capítulo B.9 del presente anexo. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.

(11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

▼M4

(14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729-837.

(18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(19) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(20) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(21) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(22) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(23) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(24) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(25) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

▼**M4**

(30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(31) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(32) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

*Apéndice 1*

DEFINICIÓN

**Sustancia problema:** cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼B

## B.31. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA EL DESARROLLO PRENATAL

### 1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 414 (2001).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad para el desarrollo tiene por objeto proporcionar información general sobre los efectos de la exposición prenatal en la hembra grávida sometida a ensayo y en el organismo intrauterino en desarrollo; incluye, en particular, la evaluación de los efectos sobre la madre, así como la muerte, anomalías estructurales y alteraciones del crecimiento del feto. Pese a que las deficiencias funcionales constituyen un aspecto importante del crecimiento, no se contemplan en el presente método de ensayo. Pueden investigarse al margen o como complemento de este método en un estudio de neurotoxicidad para el desarrollo. Este último y el estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones pueden emplearse para detectar deficiencias funcionales y otros efectos postnatales.

En algunos casos particulares, puede ser necesario adaptar el protocolo de este ensayo, en función, por ejemplo, de las propiedades fisicoquímicas o toxicológicas de la sustancia de ensayo. La adaptación será aceptable si se dispone de datos científicos convincentes que indiquen que de esa manera el ensayo proporcionará mayor información. En tal caso, esos datos científicos deberán incluirse minuciosamente en el informe del ensayo.

### 1.2. DEFINICIONES

**Toxicología del desarrollo:** estudio de los efectos adversos sobre un organismo en desarrollo, que pueden producirse tras la exposición antes de la concepción y durante el desarrollo prenatal y postnatal hasta la maduración sexual. Los principales signos de la toxicidad para el desarrollo son la muerte del organismo, las anomalías estructurales, la alteración del crecimiento y las deficiencias funcionales. Antiguamente, la toxicología del desarrollo solía denominarse teratología.

**Efecto adverso:** toda alteración respecto a una situación de referencia, relacionada con el tratamiento, que disminuya la capacidad del organismo para sobrevivir, reproducirse o adaptarse al entorno. La toxicología del desarrollo, considerada en su sentido más amplio, incluye todos los efectos que afectan al desarrollo normal del producto de la concepción, antes y después del nacimiento.

**Alteración del crecimiento:** alteración que afecte al peso o el tamaño del cuerpo o los órganos de la descendencia.

**Alteraciones (anomalías):** alteraciones estructurales en el desarrollo, que incluyen las malformaciones y las variaciones (28).

**Malformación/anomalía grave:** cambio estructural que se considere perjudicial (también puede resultar letal) para el animal y, por lo general, infrecuente.

▼B

**Variación/anomalía leve:** cambio estructural que se considere poco o nada perjudicial para el animal; puede tener carácter transitorio y ser relativamente frecuente en la población de control.

**Producto de la concepción:** conjunto de los derivados de un óvulo fecundado, en cualquier fase del desarrollo, desde la fecundación hasta el nacimiento, incluidas las membranas extraembrionarias y el embrión o el feto.

**Implantación (anidación):** fijación del blastocisto en la túnica epitelial del útero, que incluye la penetración por el epitelio uterino y la inserción en el endometrio.

**Embrión:** primera fase del desarrollo de un organismo, en particular, la fase de desarrollo de un huevo fecundado desde que aparece el eje mayor hasta que quedan representadas las estructuras principales.

**Embriotoxicidad:** novicidad para la estructura, el desarrollo, el crecimiento y/o la viabilidad normales de un embrión.

**Feto:** descendencia nonata en el período postembrionario.

**Fetotoxicidad:** novicidad para la estructura, el desarrollo, el crecimiento y/o la viabilidad normales de un feto.

**Aborto:** expulsión prematura del útero de los productos de la concepción (embrión o feto no viable).

**Resorción:** absorción de un producto de la concepción que muere una vez implantado en el útero.

**Resorción precoz:** signos de implantación sin embrión ni feto reconocible.

**Resorción tardía:** embrión o feto muerto, que presenta cambios degenerativos externos.

**NOAEL:** sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis o grado de exposición más alto al que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Por lo general, se administra la sustancia de ensayo a las hembras grávidas al menos desde la implantación hasta la víspera del sacrificio, que debe llevarse a cabo tan cerca como sea posible de la fecha probable del parto, pero no demasiado tarde, para evitar la pérdida de datos en caso de parto prematuro. El método de ensayo no se refiere únicamente al período de la organogénesis (del 5° al 15° día en los roedores y del 6° al 18° en el conejo), sino que estudia asimismo los efectos a lo largo de toda la gestación, desde la fase previa a la implantación, en su caso, hasta la víspera de la cesárea. Las hembras se sacrifican poco antes de la cesárea. Se estudia el contenido uterino y se examinan los fetos para detectar las anomalías externas visibles y los cambios en los tejidos blandos y el esqueleto.

▼B

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.5.1. **Selección de la especie animal**

Se recomienda realizar el ensayo con la especie más adecuada y utilizar las especies y cepas de laboratorio más comunes en los ensayos de toxicidad para el desarrollo prenatal. El roedor idóneo es la rata y, entre los no roedores, el conejo. Deberá justificarse el empleo de otra especie.

1.5.2. **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3°) en el caso de los roedores y de 18 °C (+ 3°) en el caso de los conejos, y con una humedad relativa mínima del 30 % y preferiblemente inferior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, si bien lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se proporciona una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad.

El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas. Si bien es preferible colocar a los animales apareados en jaulas individuales, también pueden alojarse en grupos reducidos.

1.5.3. **Preparación de los animales**

Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. El peso y la edad de los animales de experimentación debe ser lo más uniforme posible en todos los lotes de ensayo. Deben emplearse hembras adultas jóvenes y nulíparas para cada dosis. Las hembras han de aparearse con machos de la misma especie y cepa y debe evitarse el apareamiento entre animales hermanos. En el caso de los roedores, el día 0 de la gestación es el día en que se observa un tapón vaginal y/o la presencia de semen; en el caso de los conejos, suele ser el día del coito o de la inseminación artificial, si se emplea esta técnica. Las hembras apareadas se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto. Si el apareamiento se efectúa por grupos, los animales de un mismo grupo se repartirán de forma uniforme entre los distintos lotes. Asimismo, las hembras inseminadas por un mismo macho se repartirán de manera uniforme entre los lotes.

1.6. PROCEDIMIENTO

1.6.1. **Número y sexo de los animales**

Cada lote de ensayo y de control deberá estar integrado por una cantidad de hembras que permita practicar la autopsia de unos 20 ejemplares que presenten puntos de implantación. Los lotes de menos de 16 hembras con puntos de implantación pueden resultar inadecuados. La mortalidad materna no invalida necesariamente el estudio, siempre y cuando no supere el 10 % aproximadamente.

▼B

1.6.2. **Preparación de las dosis**

Si se emplea un aditivo u otro vehículo para facilitar la dosificación, deberán tenerse presentes los efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo y retención o excreción de la sustancia de ensayo, los efectos sobre las propiedades químicas de esta que puedan modificar su toxicidad, y los efectos sobre el consumo de alimentos y agua y sobre el estado nutricional de los animales. El vehículo no debe ser tóxico para el desarrollo ni afectar a la reproducción.

1.6.3. **Posología**

Por lo general, la sustancia de ensayo se administra todos los días desde la implantación (por ejemplo, el quinto día después del apareamiento) hasta la víspera del día en que esté prevista la cesárea. Si los estudios preliminares disponibles no señalan un riesgo elevado de pérdidas preimplantatorias, puede administrarse el tratamiento durante todo el período de gestación, desde el apareamiento hasta la víspera de la cesárea. Se sabe que el estrés y la manipulación indebida durante la gestación pueden ocasionar pérdidas prenatales. Con objeto de evitar las pérdidas prenatales independientes del tratamiento, debe evitarse la manipulación innecesaria de las hembras grávidas y el estrés debido a factores externos como el ruido.

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los animales sanos se distribuyen al azar entre el lote de control y los lotes de ensayo. Las dosis han de ser progresivas para obtener una gradación de efectos tóxicos. A menos que las características fisicoquímicas o las propiedades biológicas de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos para el desarrollo y/o en la madre (signos clínicos o disminución del peso corporal), pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. Al menos una dosis intermedia debe producir los efectos tóxicos mínimos observables. La dosis mínima no debe resultar tóxica en absoluto para la madre ni para el desarrollo. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis y la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si bien es cierto que se trata de determinar la NOAEL en la madre, los estudios que no permiten determinarla también son aceptables (1).

Las dosis deben establecerse tomando en consideración todos los datos disponibles sobre la toxicidad y la información complementaria relativa al metabolismo y la toxicocinética de la sustancia de ensayo o productos afines. Dicha información servirá asimismo para justificar la pertinencia de la gama de dosis.

Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia de ensayo, pero sí el vehículo en caso de que este se utilice para la sustancia. Debe administrarse el mismo volumen de sustancia de ensayo o de vehículo a todos los lotes. Los animales del lote o lotes de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Los lotes de control a los que se administra el vehículo han de recibir el mayor volumen que se haya utilizado (el que se administre al lote tratado con la dosis inferior).

▼B

1.6.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente, al menos, a 1 000 mg/kg peso corporal/día, administrada por vía oral y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio no se produce ningún efecto tóxico observable en las hembras grávidas ni en la progenie y si, a la luz de los datos disponibles (por ejemplo, sobre sustancias con características estructurales y/o metabólicas similares), no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con tres dosis. Según el grado previsto de exposición humana, puede ser preciso administrar una dosis oral superior en el ensayo límite. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo las que determinan y limitan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse (por ejemplo, la aplicación cutánea no debe producir toxicidad local grave).

1.6.5. **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo y el vehículo suelen administrarse mediante intubación oral. Si se opta por otra vía de administración, deberá motivarse y justificarse, y procederse a las modificaciones pertinentes (2) (3) (4). La sustancia de ensayo debe administrarse todos los días a la misma hora más o menos.

Por lo general, la dosis que se administra a cada animal se calcula con arreglo a la última determinación del peso corporal, si bien conviene ser prudente al adaptar la dosis en el último período de la gestación. Debe considerarse la información disponible para seleccionar la dosis de manera que se evite una toxicidad excesiva para la madre. Si, a pesar de todo, se observa una toxicidad excesiva en las madres tratadas, deberán sacrificarse por métodos compasivos. Si varias hembras grávidas presentan signos de toxicidad excesiva, se contemplará la posibilidad de sacrificar todo el lote tratado con esa dosis. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal y no debe superar 1 ml/l00 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/l00 g de peso corporal. En caso de que se emplee aceite de maíz como vehículo, el volumen no debe superar 0,4 ml/l00 g de peso corporal. La variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

1.6.6. **Observación de las madres**

Las observaciones clínicas y el correspondiente registro deben efectuarse al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registra el estado clínico de los animales y, en particular, los animales muertos o moribundos, las alteraciones pertinentes del comportamiento y todos los signos de toxicidad manifiesta.

1.6.7. **Peso corporal y consumo de alimentos**

Los animales deben pesarse el día 0 de la gestación o, a más tardar, el día 3 si se trata de animales ya apareados procedentes de un criador externo; a continuación, el primer día de tratamiento, al menos cada 3 días durante el período de administración y, por último, el día del sacrificio.

▼B

Se registra el consumo de alimentos cada 3 días, coincidiendo con los días en que se pesen los animales.

1.6.8. **Autopsia**

Se sacrifican las hembras la víspera del día previsto para al parto. Aquellas que presenten signos de aborto o parto prematuro antes de la fecha en que esté previsto darles muerte serán sacrificadas y sometidas a un examen macroscópico exhaustivo.

Tras el sacrificio o la muerte en el transcurso del estudio, las hembras se someten a un examen macroscópico para detectar cualquier cambio patológico o anomalía estructural. Con objeto de minimizar los sesgos, es preferible efectuar la observación de las madres durante la cesárea y el examen posterior del feto sin conocer la dosis administrada.

1.6.9. **Examen del contenido uterino**

Inmediatamente después del sacrificio o tan pronto como sea posible tras la muerte del animal, se extrae el útero y se comprueba el estado de gravidez. También se examinarán los úteros que no parezcan grávidos (por ejemplo, mediante tinción de sulfuro amónico en el caso de los roedores y tinción de Salewski u otro método adecuado, en el de los conejos) para confirmar la ausencia de gravidez (5).

Se pesan los úteros grávidos con el cuello, salvo los de las hembras que hayan muerto durante el estudio.

Se cuenta el número de cuerpos amarillos en las hembras grávidas.

Se examina el contenido uterino para determinar el número de embriones o fetos muertos y de fetos viables. Es preciso describir el grado de resorción para calcular la fecha aproximada de la muerte del producto de la concepción (véase el apartado 1.2).

1.6.10. **Examen de los fetos**

Se determina el sexo y el peso corporal de cada feto.

Se examinan todos los fetos para ver si presentan alteraciones externas (6).

Se ve, asimismo, si presentan alteraciones del esqueleto o los tejidos blandos (por ejemplo, variaciones y malformaciones o anomalías) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Es aconsejable, pero no indispensable, clasificar las alteraciones fetales. Si se efectúa la clasificación, deben establecerse claramente los criterios que definan cada clase. Se estudiará detenidamente si ha habido alteraciones en el desarrollo del tracto genital.

En el caso de los roedores, se prepara aproximadamente la mitad de cada camada para estudiar las alteraciones del esqueleto. El resto se prepara para el estudio de las alteraciones de los tejidos blandos, que se efectuará en cortes seriados realizados por métodos reconocidos o apropiados o mediante técnicas finas de disección macroscópica.

▼B

Si se han empleado no roedores, por ejemplo conejos, todos los fetos se someten a examen para detectar posibles alteraciones de los tejidos blandos y el esqueleto. Se diseccionan cuidadosamente los cuerpos de los fetos para buscar alteraciones de los tejidos blandos; esta operación puede incluir técnicas que permitan examinar más exhaustivamente la estructura cardíaca interna (25). Se toman las cabezas de la mitad de los fetos analizados de esta manera y se preparan para evaluar las alteraciones de los tejidos blandos (en particular, ojos, cerebro, conductos nasales y lengua), mediante técnicas clásicas de cortes seriados (26) u otro método que presente la misma sensibilidad. Se preparan los cuerpos de esos fetos y los de los fetos intactos restantes para el estudio de las alteraciones del esqueleto mediante los métodos descritos para los roedores.

## 2. RESULTADOS

### 2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada madre y su progenie y resumirse en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio compasivo, el número de hembras grávidas, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de observaciones de los embriones o fetos y todos los datos pertinentes sobre la camada.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado, tomando la camada como unidad para el análisis de los datos. La elección de los métodos estadísticos debe efectuarse en la fase de diseño del estudio y justificarse. Deben registrarse también los datos relativos a los animales que no sobrevivan hasta la fecha programada para el sacrificio y, si procede, pueden incluirse en las medias de los lotes. La pertinencia de dichos datos y, por tanto, la decisión de incluirlos o no en las medias de los lotes, debe valorarse caso por caso y justificarse.

### 2.2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal deben evaluarse respecto a los efectos observados. La evaluación debe incluir la información siguiente:

— resultados de los ensayos en las madres y los embriones o fetos, incluida la evaluación de la relación, o la ausencia de relación, entre la exposición de los animales a la sustancia de ensayo y la incidencia y gravedad de todos los efectos observados,

— criterios aplicados, en su caso, para clasificar las alteraciones fetales externas, de los tejidos blandos y del esqueleto,

▼B

— si procede, datos previos relativos a los controles para afinar la interpretación de los resultados del estudio,

— cifras empleadas en el cálculo de todos los índices o porcentajes,

— análisis estadístico apropiado de los resultados del estudio e inclusión de información suficiente sobre el método empleado, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluarlo y reconstruirlo.

Si el estudio no pone de manifiesto ningún efecto tóxico, debe valorarse la pertinencia de efectuar experimentos complementarios para determinar la absorción y la biodisponibilidad de la sustancia de ensayo.

2.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los estudios de toxicidad para el desarrollo prenatal proporcionan información sobre los efectos de la exposición repetida a una sustancia administrada durante la gravidez en las madres y en el desarrollo intrauterino de su progenie. Los resultados del estudio han de interpretarse a la luz de los de los estudios de toxicidad subcrónica, reproducción, toxicocinéticos y de otro tipo. Dado que el estudio se centra tanto en la toxicidad general para la madre como en la toxicidad para el desarrollo, los resultados permiten distinguir en cierta medida los efectos sobre el desarrollo que se producen en ausencia de toxicidad general de los que se manifiestan únicamente a dosis que también son tóxicas para la madre (27).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas.

— identificación, incluido el número CAS si se conoce;

— pureza.

Vehículo (si procede):

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

Animales sometidos a ensayo:

— especie y cepa empleada,

— número y edad de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

— justificación de la elección de las dosis,

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado,

▼B

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede,

— condiciones ambientales,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Resultados:

Datos relativos a la toxicidad para la madre en función de las dosis, indicando al menos lo siguiente:

— número de animales al principio del ensayo, número de animales supervivientes, número de hembras grávidas, número de abortos y número de partos prematuros,

— fecha de las muertes sobrevenidas durante el ensayo y número de animales que han sobrevivido hasta el sacrificio,

— datos sobre los animales que no hayan sobrevivido hasta el sacrificio, y no incluidos, en las comparaciones estadísticas entre lotes,

— día de la observación de cada signo clínico anómalo y evolución posterior,

— peso corporal, variación del mismo y peso del útero grávido, con inclusión facultativa de la variación del peso corporal corregida en función del peso del útero grávido,

— consumo de alimentos y de agua, si se ha medido,

— hallazgos de la autopsia, incluido el peso uterino,

— NOAEL relativas a los efectos sobre la madre y sobre el desarrollo.

Datos relativos al desarrollo por dosis y camada (con implantaciones), en particular:

— número de cuerpos amarillos,

— número de implantaciones, número y porcentaje de fetos vivos y muertos y número de resorciones,

— número y porcentaje de pérdidas pre y postimplantatorias.

Datos relativos al desarrollo por dosis y camada (con fetos vivos), en particular:

— número y porcentaje de crías vivas,

— proporción de machos y hembras,

— peso corporal de los fetos, preferiblemente por sexo y sin distinción por sexo,

— malformaciones externas, de los tejidos blandos y el esqueleto y otras alteraciones pertinentes,

— criterios de clasificación, si procede,

▼B

— número total y porcentaje de fetos y de camadas que presenten alguna alteración externa, de los tejidos blandos o el esqueleto; tipos e incidencia de cada anomalía y demás alteraciones pertinentes.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399-410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386-398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1-8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archivfur Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171-173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; :381-391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47:229-242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for-Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127:291-306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9;:398-408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309-316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169-181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163-173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411-445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61 -63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313-355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181-188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principies and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251-277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Vamagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticida Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233-239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37-38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126-144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798-63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormialities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249-292.

▼M4

## B.32. ENSAYO DE CARCINOGÉNESIS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 451 de la OCDE (2009). Las TG 451 originales sobre los estudios de carcinogénesis se adoptaron en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.32 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (2) (3) (4) (5) (6). La actualización de este método de ensayo B.32 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.30. Ensayo de toxicidad crónica y B.33. Ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, con el fin de obtener más, información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. Este método de ensayo B.32 ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales. Conviene señalar, no obstante, que algunos pormenores y requisitos pueden variar en el caso de los productos farmacéuticos (véase el documento de orientación S1B de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), para los ensayos de carcinogénesis de los productos farmacéuticos).

2. La mayoría de los ensayos de carcinogénesis se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (6), con las debidas modificaciones. Se ofrecen más indicaciones sobre el diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de carcinogénesis son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la elección de la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de carcinogénesis. Si bien los estudios de carcinogénesis que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la carcinogénesis por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, parámetros clínicos e histopatológicos, etc. La OCDE dispone de documentación orientativa sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (7) (8) y por vía cutánea (7). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplen la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (8). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (11) del presente anexo.

▼M4

5. Un estudio de carcinogénesis proporciona información sobre los factores de riesgo para la salud derivados de la exposición continuada durante un período que puede llegar a ocupar la vida entera de la especie animal investigada. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema, incluida la carcinogénesis potencial, y puede ayudar a determinar los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede facilitar una estimación del máximo nivel de dosis sin efectos tóxicos observados (NOAEL) y, en el caso de carcinógenos no genotóxicos, de las respuestas tumorales, que servirá para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.

6. Los objetivos de los estudios de carcinogénesis realizados según este método de ensayo son:

— la identificación de las propiedades cancerígenas de una sustancia problema que puedan provocar una incidencia elevada de neoplasias, una mayor proporción de neoplasias malignas o una reducción del tiempo de aparición de las neoplasias, en comparación con los grupos de control,

— la identificación del órgano o los órganos diana de la carcinogénesis,

— la determinación del tiempo que tardan en aparecer las neoplasias,

— la caracterización de la relación dosis-respuesta tumoral,

— la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),

— la extrapolación de los efectos cancerígenos a los niveles de dosificación inferiores de la exposición humana,

— la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación de la carcinogenicidad potencial de una sustancia problema, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia estudiada antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en la carcinogenicidad potencial y minimizar el uso de animales. La información previa y la consideración en torno al modo de acción de un supuesto cancerígeno (2) (7) (12) (13) (14) (15) reviste particular importancia, toda vez que el diseño óptimo del ensayo de una sustancia química variará según se trate o no de un cancerígeno genotóxico hipotético o conocido. Se ofrecen otras consideraciones sobre el modo de acción en el documento de orientación nº 116 (7).

8. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo,* incluidos los ensayos de genotoxicidad; el uso o usos previstos y la exposición humana potencial; los datos de (Q)SAR previos y los datos de mutagenicidad/genotoxicidad, carcinogenicidad y otros datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines; los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y los

▼M4

datos derivados de otros estudios de exposición continuada. La evaluación de la carcinogénesis debe emprenderse una vez que se ha recabado la información inicial en los ensayos de toxicidad por administración continuada durante 28 días y/o 90 días. También pueden aportar una información valiosa los ensayos de inducción-estimulación de cáncer a corto plazo. Se hará un planteamiento secuencial de los estudios de carcinogénesis como parte de la evaluación global de los efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (16) (17) (18) (19).

9. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Aspectos importantes son el ajuste de la supervivencia en el análisis estadístico, el análisis de los riesgos tumorales acumulativos en relación con el tiempo de supervivencia, el análisis del tiempo que tarda en aparecer el tumor y el análisis en caso de terminación prematura de uno o más grupos. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y se hace referencia a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (7) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (20).

10. Cuando se efectúa un estudio de carcinogénesis, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de signos clínicos como parámetros compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (21), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o el sufrimiento, o reducir la dosis experimental.

11. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (7) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (22) (23). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo u objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los factores de riesgo, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y de su importancia, por otro. Ello tiene especial trascendencia cuando se proyecta (punto 12) un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 del presente anexo).

12. Se considerará la posibilidad de efectuar un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (capítulo B.30 de este anexo) y un ensayo de carcinogénesis (presente método de ensayo B.32). El ensayo combinado permite mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un ensayo combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis (capítulo B.33 de este anexo) habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 11 y 22-25) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados.

▼M4

13. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 116 (7).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. La sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas, habitualmente por vía oral, a varios grupos de animales de experimentación durante la mayor parte de su existencia. También se aceptan las vías inhalatoria o cutánea. Se observa atentamente a los animales por si aparecen signos de toxicidad o lesiones neoplásicas. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

15. El presente método de ensayo está diseñado fundamentalmente para la determinación y evaluación de la carcinogénesis en roedores (punto 2). Se podrá considerar el uso de especies no roedoras cuando los datos previos indiquen que son más útiles para la predicción de los efectos sobre la salud humana. Se justificará la elección de la especie. La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Si bien el uso de ratones en los ensayos de carcinogénesis puede ser de utilidad limitada (24) (25) (26), algunas normativas en vigor siguen exigiendo que se realicen ensayos de carcinogénesis en ratones a no ser que se establezca que son científicamente innecesarios. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomopatología. Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

16. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. Los ensayos de carcinogénesis se efectuarán preferiblemente en animales de la misma procedencia y cepa que los empleados en los estudios preliminares de toxicidad de duración menor; ahora bien, si los animales de esa procedencia y variedad han demostrado incapacidad para cumplir los criterios de supervivencia normalmente aceptados para los estudios a largo plazo [véase el documento de orientación nº 116 (7)], se planteará la posibilidad de usar una cepa que presente una tasa de supervivencia aceptable en los ensayos a largo plazo. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

**Alojamiento y alimentación de los animales**

17. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (27) (28) (29). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se

▼M4

mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará en el informe final. Así mismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia problema se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de dicha sustancia y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

**Preparación de los animales**

18. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los, animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Después de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, que se le grabará de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio pertinente.

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

19. Se emplearán animales de ambos sexos. Se estudiará un número de animales suficiente para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. Por consiguiente, cada grupo de dosis y de control deberá contener como mínimo 50 animales de cada sexo. Dependiendo de la finalidad del estudio, cabe la posibilidad de aumentar la potencia estadística de las estimaciones esenciales haciendo una asignación diferencial de los animales a los distintos grupos de dosis, de modo que haya más de 50 individuos en los grupos de dosis inferior; esto permite estimar el potencial carcinógeno a dosis bajas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que un aumento moderado del tamaño del grupo incrementará relativamente poco la potencia estadística del estudio. Se ofrece más información sobre el diseño estadístico y la selección de los niveles de dosis para maximizar la potencia estadística del estudio en el documento de orientación nº 116 (7).

**Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela**

20. Si está científicamente justificado, se puede hacer una provisión de animales para sacrificarlos durante el ensayo y así obtener datos sobre la progresión de las alteraciones neoplásicas y sobre los mecanismos de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración continuada realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Si en el diseño experimental se incluyen animales para sacrificarlos durante el ensayo, lo habitual es que el lote sacrificado esté compuesto por 10 animales de cada sexo, y el número total de animales investigados se incrementará en esta misma medida. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar su estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (30). Se ofrecen más indicaciones en el documento de orientación nº 116 (7).

▼M4

**Grupos de dosis y posología**

21. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis. Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.

22. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Tomando en consideración los factores que se indican en el punto 23 que sigue, normalmente el nivel de dosis más elevado será tal que provoque signos de toxicidad, por ejemplo, manifestada por una merma de la ganancia de peso corporal (aproximadamente el 10 %). Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal.

23. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y, dependiendo del modo de acción de la sustancia problema, un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 25). Para establecer las dosis inferiores se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral, o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja.

24. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de las características de la sustancia y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.

25. Tal como se expone en el documento de orientación nº 116 (7), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:

— los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la relación dosis-respuesta,

— la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre la dosimetría externa e interna,

— las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,

— aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,

▼M4

— aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,

— los niveles de exposición humana que cabe prever.

26. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.

**Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema**

27. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable de que la exposición humana a la sustancia problema se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.

28. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.

29. Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administra con los alimentos, se puede usar una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en términos de peso corporal (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.

▼M4

30. En los ensayos de administración oral, la sustancia problema se administra a los animales diariamente (siete días por semana), durante un período que suele ser de 24 meses en el caso de los roedores (véase también el punto 32). Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (11), durante un período de 24 meses. La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición será habitualmente de 24 meses. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (9).

31. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (31). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo.

**Duración del estudio**

32. La duración del estudio suele ser de 24 meses en el caso de los roedores, lo que constituye la mayor parte del período de existencia de los animales investigados. Siempre que se justifique, se podrán aplicar períodos mayores o menores en función del ciclo de vida de la especie y la cepa investigadas. En el caso de determinadas cepas de ratones, como AKR/J, C3H/J o C57BL/6J, puede estar más justificada una duración de 18 meses. Seguidamente se facilitan algunas indicaciones acerca de la duración, la terminación del estudio y la supervivencia; otras consideraciones, entre ellas la aceptabilidad de un resultado de carcinogénesis negativa en función de la supervivencia observada en el estudio, se pueden consultar en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7) sobre el diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis.

— Se planteará la terminación del estudio cuando el número de supervivientes en los grupos de dosis más baja o de control sea menor del 25 por ciento.

— Si las muertes prematuras por toxicidad se producen solo en el grupo de dosis más elevada, ello no debe motivar la terminación del estudio.

— Se contabilizará por separado la supervivencia de cada sexo.

— El estudio no debe prolongarse más allá del instante en que los datos derivados del mismo se muestren insuficientes para permitir una evaluación estadísticamente significativa.

▼M4

OBSERVACIONES

33. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse además una observación diaria de los eventuales signos específicos de importancia toxicológica, teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda. Se prestará especial atención al desarrollo de tumores; se registrarán el momento de aparición y localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.

*Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria*

34. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

*Hematología, bioquímica clínica y otras valoraciones*

35. Con el fin de maximizar la información derivada de la investigación, especialmente en lo que se refiere al modo de acción, a criterio del director del estudio se podrán tomar muestras de sangre para análisis hematológicos y de bioquímica clínica. También pueden estar indicados los análisis de orina. En el documento de orientación nº 116 (7) se comenta el interés de obtener este tipo de muestras en el marco de un ensayo de carcinogénesis. Si se considera oportuno, se podrán obtener muestras de sangre para hematología y bioquímica clínica y muestras de orina para análisis, como mínimo en 10 animales de cada sexo y lote, tanto antes del sacrificio durante el ensayo (punto 20) como en el momento de su conclusión. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia y, en su caso, se conservarán en las debidas condiciones. También se pueden preparar frotis de sangre, especialmente si se sospecha que la médula ósea es el órgano diana, aunque se ha cuestionado el valor de estas muestras para la evaluación del potencial cancerígeno u oncógeno (32).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

*Autopsia macroscópica*

36. Todos los animales del estudio excepto los centinela (véase el punto 20) y otros animales satélite se someterán a una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. La autopsia de los animales centinela y de otros animales satélite se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio. El pesaje de los órganos no suele formar parte de un estudio de carcinogénesis, dado que los cambios geriátricos y, en fases más avanzadas, el desarrollo de tumores introducen confusión en la interpretación de los datos sobre el peso de los órganos. No obstante, estos datos pueden ser cruciales para sopesar las pruebas y, especialmente, las consideraciones sobre el modo de acción. Si forman parte de un estudio satélite, se recogerán a lo más tardar un año después de iniciar el estudio.

▼**M4**

37. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (33) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Todas las lesiones macroscópicas | Corazón | Páncreas | Estómago (rumen, estómago glandular) |
| Cápsulas suprarrenales | Íleo | Glándulas paratiroides | [Dientes] |
| Aorta | Yeyuno | Nervios periféricos | Testículos |
| Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia) | Riñón | Hipófisis | Timo |
| Intestino ciego | Glándulas lacrimales (extraorbitales) | Próstata | Tiroides |
| Cuello del útero | Hígado | Recto | [Lengua] |
| Glándulas coagulantes | Pulmón | Glándulas salivales | Tráquea |
| Colon | Ganglios linfáticos (superficiales y profundos) | Vesículas seminales | Vejiga urinaria |
| Duodeno | Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin son visiblemente diseccionables, también las masculinas) | Músculo esquelético | Útero (y cuello) |
| Epidídimo | [Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales] | Piel | [Uréteres] |
| Ojos (y retina) | Esófago | Médula espinal (tres secciones: cervical, medio-dorsal y lumbar) | [Uretra] |
| [Fémur y articulación tibiofemoral] | [Bulbo olfativo] | Bazo | Vagina |
| Vesícula biliar (en especies distintas de la rata) | Ovarios | [Esternón] | Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula |
| Glándula de Harder | | | |

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se conservarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 y B.29 del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

▼M4

*Examen histopatológico*

38. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (33). Como mínimo se examinarán los siguientes tejidos:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

— todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,

— todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas, incluidos tumores,

— cuando se observen alteraciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis más elevada, los mismos tejidos afectados se examinarán en todos los animales de los restantes grupos de dosis,

— en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

DATOS E INFORME

**Datos**

39. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.

40. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales de control del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines, y haberse generado en los cincos años precedentes al estudio en cuestión.

41. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 9). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.

**Informe del ensayo**

42. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

— Datos de identificación.

▼**M4**

— Procedencia de la sustancia.

— Número de lote.

— Certificado de análisis químico.

*Vehículo (si procede):*

— Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

*Animales de ensayo:*

— Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.

— Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.

— Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— Peso de cada animal al inicio del ensayo.

*Condiciones del ensayo:*

— Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.

— Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.

— Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.

— Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.

— Vía y método de administración de la sustancia problema.

— En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.

— Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.

— Datos sobre la calidad de los alimentos y del agua.

*Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal)*

*Generalidades*

— Datos de supervivencia.

— Peso corporal y variaciones del mismo.

— Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingesta de agua cuando proceda.

— Datos toxicocinéticos (en su caso).

— Oftalmoscopia (en su caso).

— Hematología (en su caso).

— Bioquímica clínica (en su caso).

▼**M4**

*Observaciones clínicas:*

— Signos de toxicidad.

— Incidencia (y, si se ha valorado, gravedad) de cualquier anomalía.

— Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).

*Resultados de la autopsia:*

— Peso corporal en el momento de la muerte.

— Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).

— Observaciones de la autopsia; incidencia y gravedad de las anomalías.

*Examen histopatológico:*

— Observaciones histopatológicas de carácter no neoplásico.

— Observaciones histopatológicas neoplásicas.

— Correlación entre las observaciones macro y microscópicas.

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento, con una clasificación de su gravedad.

— Informes sobre las eventuales evaluaciones de las preparaciones efectuadas por otros científicos.

*Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.*

*La discusión de los resultados comprende lo siguiente:*

— Discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.

— Relación dosis-respuesta.

— Datos sobre controles históricos.

— Otras informaciones sobre el modo de acción.

— Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.

— Relevancia para los seres humanos.

*Conclusiones*

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208.

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191.

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445.

▼M4

(6) Capítulo B.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en roedores.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capítulo B.8 del presente anexo. Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.

(10) Capítulo B.29 del presente anexo. Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.

(11) Capítulo B.9 del presente anexo. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼M4

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S(2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp. 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105:1196-1203.

(27) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21:15-23.

(32) Weingand K, *et al.* (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(33) Crissman J, Goodman D, Hildebrandt P, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

*Apéndice 1*

DEFINICIÓN

**Sustancia problema:** cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼M4

## B.33. ENSAYO COMBINADO DE TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGÉNESIS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 453 de la OCDE (2009). Las TG 453 originales fueron adoptadas en 1981. Se consideró necesario adaptar este método de ensayo B.33 para dar cuenta de los avances recientes en materia de bienestar animal que plantean nuevas necesidades normativas (1) (2) (3) (4) (5). La actualización de este método de ensayo B.33 se ha realizado en paralelo con las revisiones de los capítulos del presente anexo B.32. Ensayo de carcinogénesis y B.30. Ensayo de toxicidad crónica, con el fin de obtener más información acerca de los animales utilizados en el estudio y recabar nuevos datos sobre la selección de las dosis. El presente método de ensayo ha sido diseñado para el estudio de una amplia gama de sustancias, incluso plaguicidas y productos químicos industriales. Conviene señalar, no obstante, que algunos pormenores y requisitos pueden variar en el caso de los productos farmacéuticos (véase el documento de orientación S1B de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), para los ensayos de carcinogénesis de los productos farmacéuticos).

2. La mayoría de los ensayos de toxicidad crónica y de carcinogénesis se realizan con especies de roedores, por lo que este método de ensayo se ha diseñado básicamente para el estudio de dichas especies. Cuando fuere preciso realizar estos ensayos en especies no roedoras, serán así mismo de aplicación los principios y procedimientos descritos en este método de ensayo, además de los descritos en el capítulo B.27 del presente anexo, Ensayo de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores (6), con las debidas modificaciones, tal como se especifica en el documento de orientación nº 116 de la OCDE sobre Diseño y realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (7).

3. Las tres vías de administración principales que se estudian en los ensayos de toxicidad crónica y carcinogénesis son la oral, la cutánea y la inhalatoria. La elección de una de ellas dependerá de las características físicas y químicas de la sustancia estudiada y de la vía de exposición predominante en seres humanos. Se ofrece más información sobre la elección de la vía de exposición en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

4. El presente método de ensayo centra el interés en la exposición por vía oral, la más frecuentemente usada en los estudios de toxicidad crónica y de carcinogénesis. Si bien los estudios de toxicidad crónica a largo plazo que entrañan la exposición por vía cutánea o inhalatoria pueden ser igualmente necesarios en la evaluación del riesgo para la salud humana o en determinados marcos legislativos, estas dos vías de exposición plantean una complejidad técnica considerable. Tales estudios tendrán que diseñarse según cada caso; sin embargo, el método de ensayo que aquí se describe para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica y de la carcinogénesis por administración oral podría sentar las bases de un protocolo para los estudios de toxicidad por inhalación o absorción dérmica en lo que se refiere a recomendación de períodos de tratamiento, variables clínicas e histopatológicas, etc. La OCDE dispone de documentación orientativa sobre la administración de las sustancias problema por inhalación (7) (8) y por vía cutánea (7). Para el diseño de estudios a más largo plazo que contemplen la exposición por vía inhalatoria deben consultarse específicamente los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo, además del documento de orientación de la OCDE sobre estudios de toxicidad aguda por inhalación (8). Cuando se trate de estudios que contemplen la vía cutánea se consultará el capítulo B.9 (11) del presente anexo.

▼M4

5. Un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis proporciona información sobre los factores de riesgo para la salud derivados de la exposición continuada durante un período que puede llegar a ocupar la vida entera de la especie animal investigada. El estudio proporciona información sobre los efectos tóxicos de la sustancia problema, incluida la carcinogénesis potencial, y puede ayudar a determinar los órganos diana y la posibilidad de acumulación. Puede facilitar una estimación del máximo nivel de dosis sin efectos tóxicos observados (NOAEL) y, en el caso de cancerígenos no genotóxicos, de las respuestas tumorales, que servirá para establecer los criterios de seguridad de la exposición humana. Cabe destacar la necesidad de realizar observaciones clínicas detenidas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible.

6. Los objetivos de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis realizados según este método de ensayo son:

— la identificación de las propiedades cancerígenas de una sustancia problema que puedan provocar una incidencia elevada de neoplasias, una mayor proporción de neoplasias malignas o una reducción del tiempo de aparición de las neoplasias, en comparación con los grupos de control,

— la determinación del tiempo que tardan en aparecer las neoplasias,

— la identificación de la toxicidad crónica de una sustancia problema,

— la identificación del órgano o los órganos diana de la toxicidad crónica y de la carcinogénesis,

— la caracterización de la relación dosis-respuesta,

— la identificación del nivel máximo sin efectos adversos observados (NOAEL), o punto de partida para determinar una dosis de referencia (Benchmark Dose, BMD),

— la extrapolación de los efectos cancerígenos a los niveles de dosificación inferiores de la exposición humana,

— la predicción de los efectos de toxicidad crónica que se producirán a los niveles de exposición humana,

— la recopilación de datos para investigar las hipótesis referentes al mecanismo de acción (2) (7) (12) (13) (14) (15).

CONSIDERACIONES INICIALES

7. En la determinación y evaluación del potencial de carcinogénesis y de toxicidad crónica de una sustancia, el laboratorio de ensayo deberá tener en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema antes de emprender el estudio, para así poder centrarse de manera más eficaz en sus propiedades toxicológicas y minimizar el uso de animales. La información previa y la consideración en torno al modo de acción de un supuesto cancerígeno (2) (7) (12) (13) (14) (15) reviste particular importancia, toda vez que el diseño óptimo del ensayo variará según se trate o no de un cancerígeno genotóxico hipotético o conocido. Se ofrecen otras consideraciones sobre el modo de acción en el documento de orientación nº 116 (7).

8. En el diseño del estudio serán de ayuda el conocimiento de la identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, cualquier información referente al mecanismo de acción, los resultados de cualesquiera ensayos de toxicidad *y* de genotoxicidad *in vitro* o *in vivo,* el uso o usos previstos y la exposición humana potencial, los datos de (Q)SAR previos, los datos de mutagenicidad/genotoxicidad, carcinogénesis y otros datos toxicológicos sobre sustancias estructuralmente afines, los datos toxicocinéticos disponibles (cinética de dosis única y, en su caso, de acumulación por dosis repetidas) y los datos derivados de otros estudios de exposición

▼M4

continuada. La determinación de la toxicidad crónica y la carcinogénesis solo debe emprenderse una vez que se ha recabado la información toxicológica inicial en los ensayos de toxicidad por administración continuada durante 28 días y/o 90 días. También pueden aportar una información valiosa los ensayos de inducción-estimulación de cáncer a corto plazo. Se hará un planteamiento escalonado de los estudios de carcinogénesis como parte de la evaluación global de los potenciales efectos adversos que puede tener para la salud una sustancia determinada (16) (17) (18) (19).

9. Antes de iniciar el estudio se establecerán los métodos estadísticos más adecuados para el análisis de los resultados, en función del diseño y de los objetivos experimentales. Aspectos importantes son el ajuste de la supervivencia en el análisis estadístico, el análisis de los riesgos tumorales acumulativos en relación con el tiempo de supervivencia, el análisis del tiempo que tarda en aparecer el tumor y el análisis en caso de terminación prematura de uno o más grupos. Se ofrecen orientaciones para realizar el análisis estadístico adecuado y se hace referencia a los métodos estadísticos internacionalmente aceptados en el documento de orientación (GD) nº 116 (7) y en el GD nº 35 sobre análisis y evaluación de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis (20).

10. Cuando se efectúa un estudio de carcinogénesis, son de aplicación los principios y consideraciones recogidos en el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, la evaluación y la aplicación de signos clínicos como parámetros compasivos en los animales experimentales que se usan para evaluar la seguridad (21), en particular su punto 62. Dicho punto especifica que en los estudios de administración continuada, cuando un animal muestre signos clínicos progresivos que entrañen un deterioro creciente de su estado, habrá que decidir con conocimiento de causa si se sacrifica de forma compasiva. La decisión sopesará el valor de la información que puede obtenerse si se mantiene al animal en el estudio frente al desgaste de su estado general. Si se decide mantener al animal en el ensayo, se aumentará la frecuencia de las observaciones en la medida necesaria. Cabe también la posibilidad de, sin perjudicar a los fines de la investigación, suspender temporalmente la administración para aliviar el dolor o sufrimiento, o reducir la dosis experimental.

11. Se ofrecen orientaciones y comentarios detallados sobre los principios que deben orientar la selección de la dosis en los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en el documento de orientación nº 116 (7) y en dos publicaciones del International Life Sciences Institute (22) (23). El núcleo de la estrategia de selección de la dosis depende del objetivo u objetivos principales del estudio (punto 6). Al elegir un intervalo posológico adecuado, debe buscarse un equilibrio entre el cribado de los factores de riesgo, por un lado, y la caracterización de las respuestas ante dosis bajas y de su relevancia, por otro. Ello reviste particular importancia en este estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis.

12. Se considerará la posibilidad de efectuar el presente estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis en lugar de realizar por separado un ensayo de toxicidad crónica (capítulo B.30 de este anexo) y un ensayo de carcinogénesis (capítulo B.32 de este anexo). El ensayo combinado permite una mayor eficiencia que los estudios separados en términos de tiempo y costes, y reduce en cierta medida el uso de animales, sin comprometer la calidad de los datos ni en la fase de toxicidad crónica ni en la fase de carcinogénesis. Sin embargo, cuando se emprenda un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis habrá que considerar detenidamente los principios de la selección de la dosis (puntos 11 y 22-26) y, por otro lado, se entiende que determinados marcos legislativos pueden imponer la realización de ensayos separados. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan más indicaciones sobre el diseño de los estudios combinados de toxicidad crónica y carcinogénesis dentro de los principios de máxima eficiencia para reducir el número de animales empleados y de aprovechamiento racional de los distintos métodos experimentales.

▼M4

13. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan al final del presente capítulo y en el documento de orientación nº 116 (7).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. El diseño del estudio consta de dos fases paralelas, una de toxicidad crónica y otra de carcinogénesis (consúltense sus duraciones respectivas en los puntos 34 y 35). La sustancia problema se administra generalmente por vía oral, aunque también se aceptan las vías inhalatoria y cutánea. En la fase de toxicidad crónica, la sustancia problema se administra diariamente en dosis escalonadas a varios lotes de animales experimentales, a razón de un nivel de dosis por lote, normalmente durante un período de 12 meses, si bien este puede reducirse o prolongarse en función de los requisitos normativos (véase el punto 34). La duración del estudio será suficiente para permitir que se manifiesten los posibles efectos de toxicidad acumulativa, pero sin que se confundan con las alteraciones geriátricas. El diseño del estudio puede contemplar el sacrificio de uno o más animales durante el ensayo, por ejemplo a los 3 y a los 6 meses, y a tal efecto se podrán prever lotes complementarios de animales (véase el punto 20). En la fase de carcinogénesis, la sustancia problema se administra diariamente a varios lotes de animales experimentales durante la mayor parte de su existencia. Se observa atentamente a los animales en ambas fases por si aparecen signos de toxicidad o lesiones neoplásicas. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

15. El presente método de ensayo está diseñado fundamentalmente para la determinación y evaluación de la toxicidad crónica y la carcinogénesis en roedores (punto 2). Se podrá considerar el uso de especies no roedoras cuando los datos previos indiquen que son más útiles para la predicción de los efectos sobre la salud humana. Se justificará la elección de la especie. La especie idónea es la rata, si bien pueden emplearse otras especies de roedores como el ratón. Si bien el uso de ratones en los ensayos de carcinogénesis puede ser de utilidad limitada (24) (25) (26), algunas normativas en vigor siguen exigiendo que se realicen ensayos de carcinogénesis en ratones a no ser que se establezca que son científicamente innecesarios. Las ratas y los ratones se prefieren como modelos experimentales debido a su ciclo vital relativamente corto, su amplia utilización en los estudios farmacológicos y toxicológicos, su sensibilidad a la inducción tumoral y la disponibilidad de cepas de laboratorio suficientemente caracterizadas. Debido a todas estas características, se ha podido hacer un gran acopio de información acerca de su fisiología y anatomopatología. El diseño y la realización de los estudios de toxicidad crónica y carcinogénesis en especies no roedoras, cuando proceda, se basará en los principios que se recogen en el presente método de ensayo y en el capítulo B.27 de este anexo, Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en no roedores (6). Se ofrece más información sobre la elección de la especie y la cepa de laboratorio en el documento de orientación nº 116 de la OCDE (7).

16. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos de una variedad de laboratorio de uso habitual. Los estudios combinados de toxicidad crónica y carcinogénesis se efectuarán preferiblemente en animales de la misma procedencia y cepa que los empleados en los estudios preliminares de toxicidad de duración menor; ahora bien, si los animales de esa procedencia y variedad han demostrado incapacidad para cumplir los criterios de supervivencia normalmente aceptados para los estudios a largo plazo [véase el documento de orientación nº 116 (7)], se planteará la posibilidad de usar una cepa que presente una tasa de supervivencia aceptable en los ensayos a largo plazo. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas.

▼M4

**Alojamiento y alimentación**

17. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo; el enjaulamiento individual se considerará solo si está científicamente justificado (27) (28) (29). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el ideal es el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La dieta debe satisfacer todas las necesidades nutricionales de la especie estudiada, y se mantendrá en el mínimo posible su contenido en contaminantes alimentarios, entre otros los residuos de plaguicidas, contaminantes orgánicos persistentes, fitoestrógenos, metales pesados y micotoxinas que pudieran influir en los resultados experimentales. La información analítica sobre el contenido de nutrientes y contaminantes alimentarios se consignará de forma periódica, como mínimo al inicio del estudio y cada vez que se varíe el lote de producto empleado, y se documentará en el informe final. Asímismo se consignará la información analítica sobre el agua de bebida empleada en el estudio. Cuando la sustancia se administra con el alimento, la elección de la dieta se basa en la necesidad de conseguir una mezcla apropiada de la sustancia problema y de satisfacer al mismo tiempo las necesidades nutricionales de los animales.

**Preparación de los animales**

18. Deben emplearse animales sanos, que se hayan mantenido al menos 7 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. En el caso de los roedores, la administración comenzará lo antes posible tras su destete y aclimatación, preferiblemente antes de que los animales cumplan 8 semanas de edad. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad de los animales de experimentación. La diferencia de peso entre los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control. Después de la asignación al azar, no debe haber diferencias significativas entre los grupos en las medias de peso corporal de cada sexo. De observarse diferencias estadísticamente significativas, el proceso de asignación aleatoria a los grupos deberá repetirse en la medida de lo posible. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto, que se le grabará de manera permanente mediante tatuaje, implante de microchip o cualquier otro medio pertinente.

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

19. Se emplearán animales de ambos sexos. Se empleará un número de animales suficiente para permitir una exhaustiva evaluación biológica y estadística. En el caso de los roedores, por tanto, cada grupo de dosis (como se describe en el punto 22) y de control simultáneo empleados en la fase de carcinogénesis del estudio deberá contener como mínimo 50 animales de cada sexo. Dependiendo de la finalidad del estudio, cabe la posibilidad de aumentar la potencia estadística de las estimaciones esenciales haciendo una asignación diferencial de los animales a los distintos grupos de dosis, de modo que haya más de 50 individuos en los grupos de dosis inferior; esto permite estimar el potencial carcinógeno a dosis bajas. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que un aumento moderado del tamaño del grupo incrementará relativamente poco la potencia estadística del estudio. En el caso de los roedores, cada grupo de dosis (como se describe en el punto 22)

▼M4

y de control simultáneo empleado en la fase de toxicidad crónica del estudio deberá contener como mínimo 10 animales de cada sexo. Conviene señalar que este número es menor que en el estudio de toxicidad crónica (capítulo B.30 del presente anexo). No obstante, la interpretación de los datos obtenidos con los lotes reducidos en la fase de toxicidad crónica de este estudio combinado estará respaldada por los datos de los lotes más numerosos empleados en la fase de carcinogénesis. En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales en cada grupo de dosificación de la fase de toxicidad crónica para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias. Se ofrece más información sobre el diseño estadístico y la selección de los niveles de dosis para maximizar la potencia estadística del estudio en el documento de orientación nº 116 (7).

**Provisión de animales para el sacrificio durante el ensayo, los lotes satélite y los lotes centinela**

20. Si está científicamente justificado, se puede hacer una provisión de animales para sacrificarlos durante el ensayo, por ejemplo a los 6 meses en la fase de toxicidad crónica, y así obtener datos sobre la progresión de las alteraciones no neoplásicas y sobre los mecanismos de acción. Si tal información ha sido ya proporcionada por estudios previos de toxicidad por administración continuada realizados con la misma sustancia problema, el sacrificio de animales durante el ensayo puede no estar científicamente justificado. Los animales sacrificados en el transcurso de la fase de toxicidad crónica del estudio, normalmente de 12 meses de duración (punto 34), proporcionan datos útiles para la fase de carcinogénesis, lo que permite reducir el número global de animales estudiados. Cabe la posibilidad de incluir lotes satélite en la fase de toxicidad crónica del estudio para controlar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema. Generalmente, estos se limitan al lote del nivel de dosis más elevado del estudio y al lote de control. Se podrá incluir además un lote de animales centinela (habitualmente 5 individuos de cada sexo) para supervisar el estado en cuanto a enfermedades, en caso necesario, durante el estudio (30). En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan más indicaciones sobre el diseño del estudio y la provisión del mínimo número posible de animales para el sacrificio y para los lotes satélite y centinela.

21. Si en el diseño experimental se incluyen animales satélite y/o para sacrificarlos durante el ensayo, lo habitual es que los lotes destinados a estos fines estén compuestos por 10 animales de cada sexo, y el número total de animales investigados se incrementará en esta misma medida. Los animales satélite y los sacrificados durante el ensayo se someten generalmente a las mismas observaciones (peso corporal, consumo de agua y alimentos, valoraciones de hematología y bioquímica clínica e investigaciones anatomopatológicas) que los animales observados en la fase de toxicidad crónica del estudio principal, aunque se puede establecer que, en los lotes que se sacrifiquen durante el ensayo, se restrinja dicha evaluación a aspectos cruciales como la neurotoxicidad o la inmunotoxicidad.

**Grupos de dosis y posología**

22. En el documento de orientación nº 116 (7) se facilitan indicaciones sobre todos los aspectos de la selección de la dosis y los intervalos entre las dosis. Tanto en la fase de toxicidad crónica como en la de carcinogénesis, se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. Los niveles de dosis se basan generalmente en los resultados de los estudios de determinación del intervalo o realizados con dosis repetidas a corto plazo, y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos de que se disponga en relación con la sustancia problema o con sustancias afines.

▼M4

23. En la fase de toxicidad crónica puede no ser necesario hacer un estudio completo con tres niveles de dosis, si se considera que no cabe esperar efectos adversos con un nivel de dosis equivalente como mínimo a 1 000 mg/kg peso corporal/día. Esta decisión se basará en informaciones procedentes de estudios preliminares y en la consideración de que no cabe esperar toxicidad a tenor de los datos de sustancias estructuralmente afines. Se puede establecer un límite de 1 000 mg/kg peso corporal/día, salvo si la exposición humana previsible indica la necesidad de emplear un nivel de dosis más elevado.

24. Salvo limitaciones impuestas por la naturaleza fisicoquímica o los efectos biológicos de la sustancia problema, el nivel de dosis más elevado se escogerá a fin de identificar los principales órganos diana y efectos tóxicos pero evitando una toxicidad intensa, el sufrimiento, la morbilidad o la muerte de los animales. Normalmente, el nivel de dosis superior se seleccionará de modo que induzca signos de toxicidad, como una merma en la ganancia de peso corporal (de aproximadamente el 10 %). Ahora bien, dependiendo de los objetivos del estudio (véase el punto 6), se puede establecer un techo de dosis inferior al nivel que provoque signos de toxicidad, por ejemplo si una dosis induce un efecto adverso de interés que, sin embargo, tiene escasa repercusión en el período de vida o el peso corporal.

25. Los niveles de dosis y la frecuencia de administración serán tales que permitan establecer una relación dosis-respuesta y, dependiendo del modo de acción de la sustancia problema, un valor de NOAEL o cualesquiera otras determinaciones previstas, como el valor de BMD o dosis de referencia más baja (véase el punto 27). Para establecer las dosis inferiores se tendrán en cuenta factores como la pendiente esperada de la curva dosis-respuesta, así como los niveles a los que cabe esperar cambios importantes en el metabolismo o en el mecanismo de la acción tóxica, cuando se prevea un umbral, o que constituyan un punto de partida para extrapolar la dosis más baja. Cuando se lleva a cabo un estudio combinado de toxicidad crónica y carcinogénesis, la finalidad principal es obtener información que permita evaluar el riesgo de carcinogénesis y, normalmente, la información sobre la toxicidad crónica es secundaria. Habrá que tener esto en cuenta al seleccionar los niveles de dosis y los intervalos de administración.

26. La frecuencia de administración de las dosis dependerá de los objetivos del estudio y de las características de la sustancia problema y no corresponde especificarla en este método de ensayo; los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto lote de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 6-10) entre dosis. En general se evitará aplicar factores superiores a 10, que en todo caso deberán justificarse.

27. Tal como se recoge en el documento de orientación nº 116 (7), para la selección de las dosis se tendrán en cuenta los siguientes factores:

— los intervalos supuestos o conocidos de no linealidad o puntos de inflexión en la ecuación dosis-respuesta,

— la toxicocinética y los intervalos posológicos en los que pueda haber o no inducción metabólica, saturación o no linealidad entre las dosis externas e internas,

— las lesiones precursoras, los marcadores de efecto o los indicadores de la intervención de los principales mecanismos biológicos subyacentes,

▼M4

— aspectos importantes (hipotéticos o comprobados) del modo de acción, como la dosis a partir de la cual se manifiesta toxicidad, los niveles hormonales que resultan afectados, los mecanismos homeostáticos que se alteran, etc.,

— aquellas regiones de la curva dosis-respuesta en las que se precisa hacer una estimación especialmente robusta, como el intervalo de la dosis de referencia prevista o el umbral hipotético,

— los niveles de exposición humana que cabe prever, especialmente cuando se seleccionan las dosis intermedias y bajas.

28. Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia problema, pero sí el vehículo de la misma en caso de que se utilice. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de tratamiento. En su caso, el lote de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia problema se administra con los alimentos y provoca una disminución importante de la ingesta debido a que empeoran las características organolépticas de la dieta, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo para conseguir una comparación más rigurosa.

**Preparación de las dosis y administración de la sustancia problema**

29. La sustancia problema se administra habitualmente por vía oral, mediante sonda o con el alimento o el agua de bebida. Se ofrece más información sobre las vías y los métodos de administración en el documento de orientación n$^{o}$ 116 de la OCDE (7). La vía y el método de administración dependerán de la finalidad del estudio, las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, su biodisponibilidad y la vía y el modo de exposición predominantes en los seres humanos. Se justificará debidamente la vía y el método de administración elegidos. Por razones de bienestar animal, la alimentación oral por sonda se elegirá solo cuando exista una posibilidad razonable de que la exposición humana a la sustancia se vaya a producir por la misma vía y el mismo medio de administración (como es el caso de los productos farmacéuticos). Cuando se trata de sustancias alimentarias o ambientales, entre ellas los plaguicidas, la administración se efectúa habitualmente con los alimentos o el agua de bebida. Sin embargo, en otros escenarios de estudio como la exposición ocupacional, puede ser más conveniente la administración por otras vías.

30. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema, efectos sobre las propiedades químicas de dicha sustancia que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Se recabará información acerca de la estabilidad de la sustancia problema y su homogeneidad de concentración en las disoluciones o en las dietas (en su caso) que se emplean para la administración.

31. Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. En los estudios de toxicidad a largo plazo en los que la sustancia problema se administra con los alimentos, su concentración no debe superar generalmente el límite del 5 % de la ingesta total para evitar desequilibrios nutricionales. Cuando la sustancia problema se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (mg/kg de alimento o ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales (mg/kg peso corporal), calculada con periodicidad semanal. Deberá indicarse qué alternativa se ha seguido.

▼M4

32. En el caso de la administración oral, las dosis de la sustancia problema se administran diariamente a los animales (7 días por semana) durante un período de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis); véanse también los puntos 33 y 34. Cualquier otra pauta posológica, por ejemplo, de 5 días por semana, debe justificarse. En el caso de la administración cutánea, los animales se tratan con la sustancia problema como mínimo 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana, según se especifica en el capítulo B.9 del presente anexo (11), durante un período de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis). La exposición por vía inhalatoria se efectúa durante 6 horas al día con una pauta de 7 días por semana pero, si se justifica, es admisible una pauta de 5 días por semana. El período de exposición es habitualmente de 12 meses (fase de toxicidad crónica) o de 24 meses (fase de carcinogénesis). Cuando se exponen con la técnica de solo por la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. Se justificará debidamente cualquier período de exposición inferior a 6 horas diarias. Véase también el capítulo B.8 del presente anexo (9).

33. Si la sustancia problema se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada y todos los días a la misma hora. La dosis única se administra normalmente una vez al día; pero si la sustancia es un irritante local, cabe la posibilidad de mantener la dosis total diaria repartiendo la administración en dosis divididas (dos veces al día). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen se mantendrá en el mínimo posible, y en los roedores no debe exceder generalmente de 1 ml/100 g peso corporal (31). La variabilidad en el volumen utilizado debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para garantizar un volumen constante en todas las dosis. Constituyen una excepción las sustancias potencialmente corrosivas o irritantes, que deben diluirse para evitar efectos locales graves. Se evitará la administración de concentraciones que puedan ser corrosivas o irritantes del tubo digestivo.

**Duración del estudio**

34. Si bien el período de administración y la duración de la fase crónica de este estudio es normalmente de 12 meses, su diseño permite aplicarlo a ensayos de duración menor (6 o 9 meses) o mayor (18 o 24 meses), en función de los requisitos normativos particulares o de los mecanismos específicos que se pretenda investigar. Toda desviación de este período de exposición de 12 meses deberá justificarse, particularmente si es en el sentido de acortarlo. Los animales de todos los grupos de dosis asignados a esta fase serán sacrificados en el momento previsto para la evaluación de la toxicidad crónica y las alteraciones anatomopatológicas no neoplásicas. Concluida la exposición, los lotes satélite incluidos para comprobar la reversibilidad de las eventuales alteraciones tóxicas inducidas por la sustancia problema deben mantenerse sin administración durante un período no inferior a 4 semanas ni superior a un tercio de la duración total del estudio.

35. La duración de la fase de carcinogénesis de este estudio suele ser de 24 meses en el caso de los roedores, lo que constituye la mayor parte del período de existencia de los animales investigados. Siempre que se justifique, se podrán aplicar períodos mayores o menores en función del ciclo de vida de la especie y la cepa investigadas. En el caso de determinadas cepas de ratones, como AKR/J, C3H/J o C57BL/6J, puede estar más justificada una duración de 18 meses. Seguidamente se facilitan algunas indicaciones acerca de la duración, la terminación del estudio y la supervivencia; otras consideraciones, entre ellas la aceptabilidad de un resultado de carcinogénesis negativa en función de la supervivencia observada en el estudio, se pueden consultar en el documento de orientación n$^{o}$ 116 de la OCDE (7).

▼M4

— Se planteará la terminación del estudio cuando el número de supervivientes en los grupos de dosis más baja o de control sea menor del 25 por ciento.

— Si las muertes prematuras por toxicidad se producen solo en el grupo de dosis más elevada, ello no debe motivar la terminación del estudio.

— Se contabilizará por separado la supervivencia de cada sexo.

— El estudio no debe prolongarse más allá del instante en que los datos derivados del mismo se muestren insuficientes para permitir una evaluación estadísticamente significativa.

OBSERVACIONES (FASE DE TOXICIDAD CRÓNICA)

36. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración cuando esta se haga por sonda.

37. Se someterán todos los animales a observación clínica exhaustiva como mínimo antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto), al concluir la primera semana de estudio y, en lo sucesivo, con periodicidad mensual. El protocolo de tales observaciones se organizará con el fin de minimizar las variaciones entre los observadores individuales y entre los distintos lotes experimentales. Dichas observaciones han de efectuarse fuera de la jaula de alojamiento, de preferencia en un ambiente normal y siempre a la misma hora. Las observaciones se registran cuidadosamente, preferentemente mediante sistemas de puntuación definidos de forma explícita por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de observación sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila y respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos) o comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (32).

38. Debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo similar adecuado a todos los animales antes de administrar la sustancia problema. Al concluir el estudio, el mismo examen se practicará preferiblemente a todos los animales y, obligatoriamente, a los lotes de control y de dosis más elevada. Si se observan en esos animales cambios oculares relacionados con el tratamiento, deben examinarse todos los demás. Si el análisis estructural o cualquier otra información indica toxicidad oftálmica, se aumentará la frecuencia de las exploraciones oftalmológicas.

39. Cuando se trate de sustancias para las que estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días hayan demostrado efectos neurotóxicos, las pruebas de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (32) [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (33) (34) (35)], así como la evaluación de la fuerza prensil (36) y de la actividad motriz (37), podrán hacerse facultativamente antes de iniciar el estudio, a intervalos de 3 meses durante el mismo hasta un máximo de 12 meses inclusive, y a la conclusión del estudio (si dura más de 12 meses). La bibliografía respectiva recoge más información sobre los métodos que pueden seguirse, si bien es posible emplear procedimientos distintos de los ahí descritos.

▼M4

40. Cuando los estudios previos de toxicidad por administración continuada durante 28 días o 90 días indiquen que la sustancia tiene capacidad inmunotóxica, al concluir el estudio se podrán proseguir las investigaciones de este parámetro.

*Peso corporal, consumo de alimentos y agua y eficiencia alimentaria*

41. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará asimismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

*Hematología y bioquímica clínica*

42. En las investigaciones realizadas con roedores, se practicarán exámenes hematológicos en todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo) a los 3, 6 y 12 meses y al concluir el estudio (si dura más de 12 meses). En los ensayos con ratones puede hacer falta un suplemento de animales satélite para llevar a cabo todas las valoraciones hematológicas necesarias (véase el punto 19). Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras más pequeñas de animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros hematológicos en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia.

43. Se investigarán los siguientes parámetros (38): recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de eritrocitos y de plaquetas, concentración de hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (MCV), hemoglobina corpuscular media (MCH), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada. Pueden determinarse además otros parámetros hematológicos como los cuerpos de Heinz, la morfología de otros eritrocitos atípicos o los valores de metahemoglobina, en función de la toxicidad de la sustancia problema. El planteamiento general ha de ser flexible, y adaptado a los efectos observados o esperados de la sustancia problema. Si esta ejerce efectos sobre el sistema hematopoyético, pueden estar indicados recuentos de reticulocitos y una citología de la médula ósea, que no son valoraciones habituales.

44. En los intervalos de tiempo especificados para determinar las variables hematológicas, se realizarán valoraciones de bioquímica clínica para investigar los principales efectos tóxicos sobre los tejidos y, específicamente, sobre los riñones y el hígado en las muestras de sangre obtenidas de todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo). En el caso de los ratones, pueden hacer falta animales satélite para efectuar todas las valoraciones necesarias de bioquímica clínica. Cuando se trate de especies no roedoras, se tomarán muestras de menos animales (por ejemplo, 4 animales por sexo y grupo en el caso de los perros) para las valoraciones realizadas durante el ensayo y a su conclusión. Se trate de especies roedoras o no, las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los parámetros de bioquímica clínica en los estudios previos efectuados durante 90 días con dosis afines. Se recomienda que

▼M4

los animales (a excepción de los ratones) estén en ayunas desde el día anterior a la toma de muestras ([1]). Se investigarán los siguientes parámetros (38): glucosa, urea (nitrógeno ureico), creatinina, proteínas totales, albúmina, calcio, sodio, potasio, colesterol total, al menos dos pruebas completas de la función hepatocelular (alanina-aminotransferasa, aspartato-aminotransferasa, glutamato-deshidrogenasa, ácidos biliares totales) (39) y al menos dos pruebas completas de la función hepatobiliar (fosfatasa alcalina, gamma-glutamiltransferasa, 5'-nucleotidasa, bilirrubina total, ácidos biliares totales) (39). Cuando proceda y a tenor de la toxicidad de la sustancia problema, pueden hacerse otras valoraciones de bioquímica clínica como las de triglicéridos en ayunas, hormonas específicas y colinesterasa. Por lo general, debe aplicarse un enfoque flexible, en función de los efectos observados o esperados con una sustancia determinada.

45. Se practicarán análisis de orina en todos los animales de ensayo (10 machos y 10 hembras por cada grupo), sobre muestras recogidas respetando los mismos intervalos que en los análisis de hematología y bioquímica clínica. Las valoraciones a los 3 meses no serán necesarias si no se han observado efectos sobre los análisis de orina en un estudio previo efectuado durante 90 días con dosis afines. Las recomendaciones hechas por expertos acerca de los estudios de patología clínica incluyen los siguientes parámetros (38): aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, proteínas totales y glucosa. Otras valoraciones son cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y sangre oculta. Si es necesario, pueden analizarse otros parámetros adicionales para profundizar el estudio de los efectos observados.

46. De manera general, se acepta que es necesario disponer de valores basales de hematología y bioquímica clínica antes de someter a estudio a los perros, pero no en el caso de las especies roedoras (38). Ahora bien, si los datos basales históricos (véase el punto 58) son insuficientes, se considerará la oportunidad de generar estos datos.

ANATOMÍA PATOLÓGICA

*Autopsia macroscópica*

47. Como norma debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. Sin embargo, se puede prever además la realización solo (en lotes satélite o animales sacrificados durante el ensayo) de valoraciones clave específicas, por ejemplo de neurotoxicidad o inmunotoxicidad (véase el punto 21). Estos animales no tienen que someterse a autopsia ni a las consiguientes exploraciones que se describen a continuación. La autopsia de los animales centinela se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio.

([1]) El ayuno desde la víspera es preferible para realizar ciertos análisis en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, el ayuno desde la víspera puede influir en el metabolismo general de los animales y, especialmente en los estudios en que la sustancia problema se administra con los alimentos, puede alterar la exposición diaria a dicha sustancia. Todos los animales se deben examinar en las mismas condiciones fisiológicas, por lo que se aconseja programar las evaluaciones neurológicas y detalladas en un día distinto del destinado a la toma de muestras para bioquímica clínica.

▼**M4**

48. Se registrará el peso de los órganos de todos los animales, salvo los que quedan excluidos en la última parte del punto 47. Las cápsulas suprarrenales, encéfalo, epidídimo, corazón, riñones, hígado, ovarios, bazo, testículos, tiroides (que se pesará después de la fijación, con las paratiroides) y útero de todos los animales (aparte de los moribundos y/o sacrificados a lo largo del ensayo) han de limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y se determinará el peso húmedo lo antes posible tras la disección para evitar su desecación.

49. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (40) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Todas las lesiones macroscópicas | Corazón | Páncreas | Estómago (rumen, estómago glandular) |
| Glándulas suprarrenales | Íleo | Glándulas paratiroides | [Dientes] |
| Aorta | Yeyuno | Nervios periféricos | Testículos |
| Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo y protuberancia) | Riñón | hipófisis | Timo |
| Intestino ciego | Glándulas lacrimales (extraorbitarias) | Próstata | Tiroides |
| Cuello del útero | Hígado | Recto | [Lengua] |
| Glándulas coagulantes | Pulmón | Glándulas salivales | Tráquea |
| Colon | Ganglios linfáticos (superficiales y profundos) | Vesículas seminales | Vejiga urinaria |
| Duodeno | Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin son visiblemente diseccionables, también las masculinas) | Músculo esquelético | Útero (y cuello) |
| Epidídimo | [Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales] | Piel | [Uréteres] |
| Ojos (y retina) | Esófago | Médula espinal (tres secciones: cervical, medio dorsal y lumbar) | [Uretra] |
| [Fémur y articulación tibiofemoral] | [Bulbo olfatorio] | Bazo | Vagina |
| Vesícula biliar (en especies distintas de la rata) | Ovarios | [Esternón] | Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula |
| Glándula de Harder | | | |

▼M4

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se examinarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (9) y B.29 (10) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

*Examen histopatológico*

50. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (40). Como mínimo, el examen histopatológico debe hacerse sobre:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

— todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,

— todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas,

— los tejidos diana (o los tejidos que presenten alteraciones relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis máxima) de todos los animales pertenecientes a los restantes grupos de dosis,

— en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

OBSERVACIONES (FASE DE CARCINOGÉNESIS)

51. Se observará la morbilidad o la mortalidad en todos los animales, generalmente a primera y última hora del día, incluidos los fines de semana y festivos. Debe hacerse además una observación diaria de los eventuales signos específicos de importancia toxicológica. En los ensayos en que se emplee sonda, los animales se examinarán en el período inmediatamente posterior a la administración. Se prestará especial atención al desarrollo de tumores; se registrarán el momento de aparición y localización, dimensiones, aspecto y progresión de todo tumor visible macroscópica o palpablemente.

52. Deben pesarse todos los animales al comenzar el tratamiento, como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Se medirán el consumo de alimento y la eficiencia alimentaria como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, se medirá la ingesta de agua como mínimo una vez por semana durante las 13 primeras semanas y, en lo sucesivo, al menos una vez al mes. La determinación de la ingesta de agua se contemplará así mismo en aquellos estudios en los que esté alterada la actividad de beber.

▼M4

*Hematología, bioquímica clínica y otras valoraciones*

53. Con el fin de maximizar la información derivada de la investigación, especialmente en lo que se refiere al modo de acción, a criterio del director del estudio se podrán tomar muestras de sangre para análisis hematológicos y de bioquímica clínica. También pueden estar indicados los análisis de orina. Los datos de los animales empleados en la fase de toxicidad crónica del estudio, normalmente de 12 meses de duración (punto 34), proporcionarán información sobre dichos parámetros. En el documento de orientación nº 116 (7) se comenta el interés de obtener este tipo de muestras en el marco de un ensayo de carcinogénesis. Si se toman muestras de sangre será al final del período de ensayo, justo antes del sacrificio de los animales o como parte del método de sacrificio. Las muestras de sangre se extraerán de una zona que deberá indicarse, por ejemplo por punción cardiaca o del seno retro-orbital, bajo anestesia. También se pueden preparar frotis de sangre, especialmente si se sospecha que la médula ósea es el órgano diana, aunque se ha cuestionado el valor de obtener estas muestras en la fase de carcinogénesis para la evaluación del potencial cancerígeno u oncógeno (38).

ANATOMÍA PATOLÓGICA

*Autopsia macroscópica*

54. Todos los animales del estudio excepto los centinela y otros animales satélite (véase el punto 20) se someterán a una autopsia completa que comprenda la inspección de la superficie externa del cuerpo, todos sus orificios y las cavidades craneal, torácica y abdominal y sus contenidos. La autopsia de los animales centinela y de otros animales satélite se decidirá según cada caso, a criterio del director del estudio. El pesaje de los órganos no suele formar parte de un estudio de carcinogénesis, dado que los cambios geriátricos y, en fases más avanzadas, el desarrollo de tumores introducen confusión en la interpretación de los datos sobre el peso de los órganos. No obstante, estos datos pueden ser cruciales para sopesar las pruebas y, especialmente, las consideraciones sobre el modo de acción. Si forman parte de un estudio satélite, se recogerán a lo más tardar un año después de iniciar el estudio.

55. Los tejidos que se mencionan a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico a que vayan a someterse (40) (opcional en el caso de los tejidos entre corchetes):

| | | | |
|---|---|---|---|
| Todas las lesiones macroscópicas | Corazón | Páncreas | Estómago (rumen, estómago glandular) |
| Cápsulas suprarrenales | Íleo | Glándulas paratiroides | [Dientes] |
| Aorta | Yeyuno | Nervios periféricos | Testículos |
| Encéfalo (incluidos cortes de cerebro, cerebelo, bulbo y protuberancia) | Riñón | Hipófisis | Timo |
| Intestino ciego | Glándulas lacrimales (extraorbitales) | Próstata | Tiroides |
| Cuello del útero | Hígado | Recto | [Lengua] |
| Glándulas coagulantes | Pulmón | Glándulas salivales | Tráquea |
| Colon | Ganglios linfáticos (superficiales y profundos) | Vesículas seminales | Vejiga urinaria |

▼M4

| | | | |
|---|---|---|---|
| Duodeno | Glándulas mamarias (obligatoriamente las femeninas y, sin son visiblemente diseccionables, también las masculinas) | Músculo esquelético | Útero (y cuello) |
| Epidídimo | [Vías respiratorias altas, incluidos nariz, cornetes y senos paranasales] | Piel | [Uréteres] |
| Ojos (y retina) | Esófago | Médula espinal (tres secciones: cervical, medio-dorsal y lumbar) | [Uretra] |
| [Fémur y articulación tibiofemoral] | [Bulbo olfativo] | Bazo | Vagina |
| Vesícula biliar (en especies distintas de la rata) | Ovarios | [Esternón] | Sección de médula ósea y/o aspirado reciente de médula |
| Glándula de Harder | | | |

En el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se conservarán ambos órganos. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema. En los estudios que entrañen la vía de administración cutánea, se examinarán los mismos órganos que en el caso de la administración oral, pero además es fundamental establecer un protocolo específico para la obtención y conservación de muestras de piel de la zona de aplicación. En los estudios de inhalación, los tejidos de las vías respiratorias se conservarán y examinarán siguiendo las recomendaciones de los capítulos B.8 (8) y B.29 (9) del presente anexo. Los restantes órganos y tejidos (además de los tejidos de las vías respiratorias específicamente conservados), se examinarán igual que se ha establecido en el caso de la administración oral.

*Examen histopatológico*

56. Se puede consultar el documento de orientación sobre buenas prácticas en la realización de los estudios de toxicopatología (40). Como mínimo se examinarán los siguientes tejidos:

— todos los tejidos de los animales de control y del grupo con dosis máxima,

— todos los tejidos de los animales muertos o sacrificados durante el estudio,

— todos los tejidos que presenten alteraciones macroscópicas, incluidos tumores,

— cuando se observen alteraciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento en el grupo de dosis más elevada, los mismos tejidos afectados se examinarán en todos los animales de los restantes grupos de dosis,

— en el caso de órganos pares, como riñones o cápsulas suprarrenales, se examinarán ambos órganos.

▼M4

DATOS E INFORME (TOXICIDAD CRÓNICA Y CARCINOGÉNESIS)

**Datos**

57. Se documentarán los datos de todos los parámetros evaluados en cada animal. Además, deben resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, por cada lote de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), el número de animales que presenten lesiones, el tipo de lesiones y el porcentaje de animales afectado por cada tipo de lesión. Los cuadros de datos agrupados reflejarán las medias y desviaciones típicas (en el caso de variables continuas) de los animales que presenten lesiones o efectos tóxicos, además de una escala de clasificación de las lesiones.

58. Los datos sobre controles históricos pueden resultar de ayuda en la interpretación de los resultados del estudio, por ejemplo cuando haya indicios de que los resultados arrojados por los controles simultáneos se desvían esencialmente de los datos recientes obtenidos en animales de control del mismo animalario o colonia. De ser evaluados, los datos sobre controles históricos deben proceder del mismo laboratorio, y corresponder a animales de edades y cepas afines que hayan sido analizados en los cincos años precedentes al estudio en cuestión.

59. Siempre que sea posible, deben evaluarse los resultados numéricos mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos y de los datos que vayan a analizarse debe efectuarse en la fase de diseño del estudio (punto 9). Para ello se tendrán en cuenta los ajustes de la supervivencia, en su caso.

60. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Naturaleza física, pureza y propiedades fisicoquímicas.

— Datos de identificación.

— Procedencia de la sustancia.

— Número de lote.

— Certificado de análisis químico.

*Vehículo (si procede):*

— Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua).

*Animales de ensayo:*

— Especie y cepa utilizada y motivos para elegirla.

— Número, edad y sexo de los animales al inicio del ensayo.

— Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— Peso de cada animal al inicio del ensayo.

▼**M4**

*Condiciones del ensayo:*

— Fundamento de la elección de la vía de administración y la dosis.

— Cuando proceda, métodos estadísticos aplicados al análisis de los datos.

— Pormenores de la formulación de la sustancia o de su preparación con la comida.

— Datos analíticos acerca de la concentración obtenida, la estabilidad y la homogeneidad de la preparación.

— Vía y método de administración de la sustancia problema.

— En los estudios de inhalación se indicará si es de solo por la nariz o de cuerpo entero.

— Dosis reales (mg/kg peso corporal/día) y factor de conversión de la concentración (mg/kg o ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales, en su caso.

— Datos de la calidad de los alimentos y el agua.

*Resultados (se presentarán cuadros de datos agrupados así como los datos de cada animal).*

*Generalidades:*

— Datos de supervivencia.

— Peso corporal y variaciones del mismo.

— Ingesta de alimento, cálculos de la eficiencia alimentaria, si se han hecho, e ingesta de agua cuando proceda.

— Datos toxicocinéticos, si los hay.

— Oftalmoscopia (en su caso).

— Hematología (en su caso).

— Bioquímica clínica (en su caso).

*Observaciones clínicas:*

— Signos de toxicidad.

— Incidencia (y, si se ha valorado, gravedad) de cualquier anomalía.

— Naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no).

*Resultados de la autopsia:*

— Peso corporal en el momento de la muerte.

— Pesaje de los órganos (y pesos relativos, cuando proceda).

— Observaciones de la autopsia; incidencia y gravedad de las anomalías.

*Examen histopatológico:*

— Observaciones histopatológicas de carácter no neoplásico.

— Observaciones histopatológicas neoplásicas.

▼M4

— Correlación entre las observaciones macro y microscópicas.

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas relacionadas con el tratamiento, con una escala de clasificación de su gravedad.

— Informes sobre las eventuales evaluaciones de las preparaciones efectuadas por otros científicos.

*Tratamiento estadístico de los resultados, según proceda.*

*Discusión de los resultados:*

— Discusión de cualquier hipótesis o modelo teórico.

— Relación dosis-respuesta.

— Datos sobre controles históricos.

— Otras informaciones sobre el modo de acción.

— Valores de BMD, NOAEL o LOAEL.

— Relevancia para los seres humanos.

*Conclusiones*

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.

(2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

(3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163-208

(4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145-191

(5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437-445

(6) Capítulo B.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad oral subcrónica. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en no roedores.

(7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453-Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capítulo B.8 del presente anexo. Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.

(10) Capítulo B.29 del presente anexo. Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.

(11) Capítulo B.9 del presente anexo. Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía cutánea.

▼**M4**

(12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793-801.

(13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33:581-589.

(14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89:51-56.

(15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33:591-653.

(16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1-7.

(17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9-35.

(18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37-68.

(19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69-98.

(20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.

(21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

(22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

(23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

(24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1):214.

(25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp. 279-284.

(26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105:1196-1203.

▼**M4**

(27) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DO L 276 de 20.10.2010, p. 33).

(28) National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

(29) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, December, 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

(30) GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

(31) Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, van de Vorstenbosch C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21:15-23.

(32) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(33) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999-1003.

(34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691-704.

(35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267-283.

(36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233-236.

(37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599-609.

(38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198-201.

(39) EMEA (draft) document «Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity» (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

(40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126-131.

▼**M4**

*Apéndice 1*

DEFINICIÓN

**Sustancia problema:** cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼B

B.34. **ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

Véase la Introducción general, Parte B.

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se administra la sustancia objeto de estudio, en dosis crecientes, a varios grupos de machos y hembras. Los machos deberán tratarse en la fase de crecimiento y durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 días en la rata) para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en la espermatogénesis.

Las hembras de la generación parental (P) recibirán tratamiento durante dos ciclos estrales completos, por lo menos, para que la sustancia estudiada pueda provocar algún efecto adverso en el estro. A continuación, se aparea a los animales. La sustancia ensayada se administra a los dos sexos durante el período de apareamiento, y luego únicamente a las hembras en los períodos de gestación y lactancia. El método deberá modificarse si se pretende administrar la sustancia por inhalación.

1.5. CRITERIOS CUALITATIVOS

Ninguno.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

*Preparativos*

Antes de la prueba, se distribuye al azar a los animales, que serán jóvenes y sanos, para formar grupos de tratamiento y de control. Los animales se mantienen en las condiciones de alojamiento y alimentación experimentales durante al menos 5 días previos a la prueba. Se recomienda la administración de la sustancia estudiada con la alimentación o en el agua de bebida, pero también son aceptables otras vías de administración. Todos los animales se tratarán por el mismo método durante el período experimental apropiado. Si se utiliza un vehículo u otros aditivos para facilitar la administración, estos no deberán ser tóxicos. Se administrará la sustancia los 7 días de la semana.

▼B

Animales de experimentación

Las especies preferidas son la rata y el ratón.

Han de utilizarse animales sanos, no sometidos a experimentación previa. No se utilizarán cepas de baja fecundidad. Se especificará la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales empleados.

Para evaluar debidamente la fecundidad, se estudiará tanto a los machos como a las hembras. Todos los animales tratados y de control deberán estar destetados antes del comienzo del tratamiento.

Número y sexo

Cada grupo tratado y de control comprenderá un número de animales suficiente para obtener unas 20 hembras grávidas a término o cerca de él.

El objetivo es conseguir gestaciones y progenie suficientes para permitir una evaluación significativa de la influencia de la sustancia en la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno de los animales de la generación P así como en la lactancia, el crecimiento y el desarrollo de la generación F, desde la concepción al destete.

Condiciones del ensayo

Se suministrarán alimento y agua *ad libitum.* Al acercarse el momento del parto, se aislará a las hembras grávidas en jaulas individuales para partos o de maternidad, y pueden suministrárseles materiales de nidificación.

Dosis

Se utilizarán al menos tres grupos tratados y uno de control. Si se utiliza un vehículo para administrar la sustancia probada, el grupo de control recibirá este vehículo en el volumen máximo empleado. Si una sustancia objeto de estudio causa una reducción de la ingesta o del aprovechamiento de la alimentación, puede considerarse necesario el uso de un grupo de control emparejado. Lo ideal sería que, a menos que lo impidan la naturaleza física/química, o los efectos biológicos de la sustancia estudiada, la dosis máxima provoque toxicidad, pero no mortalidad, en los animales paternos (P). La o las dosis intermedias generarán efectos tóxicos mínimos atribuibles a la sustancia ensayada, y la dosis mínima no inducirá efectos adversos observables ni en los progenitores ni en la descendencia. Cuando la sustancia se administre por alimentación forzada o en cápsulas, la dosis dada a cada animal deberá basarse en el peso de cada uno y adaptarse semanalmente a las modificaciones que experimente. En las hembras grávidas, el tratamiento puede establecerse, si se desea, en función del peso corporal en el día 0 o 6 de gestación.

Prueba de límite

Cuando se trate de una sustancia dé toxicidad escasa, si una dosis de al menos 1 000 mg/kg no produce signo de alteración del rendimiento reproductor, serán necesarios estudios con otras dosis. Si un estudio preliminar con la dosis máxima muestra signos claros de toxicidad materna, pero ningún efecto adverso en la fertilidad, serán necesarios estudios con otras dosis.

▼B

*Procedimiento*

Planes experimentales

La administración diaria de la sustancia a los progenitores machos (P) se iniciará cuando tengan unas 5 a 9 semanas de edad, previo destete y aclimatación durante al menos 5 días. En las ratas, el tratamiento continúa durante 10 semanas antes del período de apareamiento (8 semanas en ratones). Los machos se sacrificarán y examinarán al final del período de apareamiento, o bien se les mantendrá con vida y en tratamiento por si se considerara conveniente la producción de una segunda camada; se les sacrificará y examinará en algún momento antes de finalizar el estudio. En las hembras progenitoras (P), la administración se iniciará después de 5 días de aclimatación, por lo menos, y continuará durante al menos 2 semanas antes del apareamiento. El tratamiento diario de las hembras P proseguirá durante todo el período de apareamiento de 3 semanas, en la gestación y hasta el destete de la generación $F_1$. Cabe considerar la introducción de modificaciones del esquema posológico si se dispone de otros datos sobre la sustancia estudiada, como la inducción del metabolismo o la bioacumulación.

Método de apareamiento

En los estudios de toxicidad para la reproducción puede utilizarse apareamiento 1:1 (1 macho con 1 hembra) o 1:2 (1 macho con 2 hembras).

Si el apareamiento es 1:1, cada hembra se colocará con el mismo macho hasta que exista gestación o hayan transcurrido 3 semanas. Se examinará todas las mañanas a las hembras para determinar la presencia de esperma o tapones vaginales. Se considera día 0 de la gestación aquel en que se encuentre un tapón vaginal o esperma.

Las parejas que no se apareen se examinarán para determinar la causa de la infertilidad aparente.

Para ello, cabe recurrir a métodos como nuevas oportunidades de aparearse con machos o hembras que ya hayan procreado, examen microscópico de los órganos reproductores y examen del ciclo estral o de la espermatogénesis.

Tamaño de la camada

Se permitirá a los animales tratados durante el estudio de fertilidad parir naturalmente y criar a su camada libremente hasta el destete.

Cuando se recurra a un método de homogeneización de las camadas, se sugiere la técnica siguiente. Entre los días 1 y 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, 4 machos y 4 hembras por camada.

Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con 4 de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (por ejemplo, 5 machos y 3 hembras). Los ajustes no serán posibles con camadas de menos de 8 crías.

▼B

Observaciones

Se observará a cada animal al menos una vez al día durante la totalidad del período de prueba. Se anotarán los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. En los períodos de preapareamiento y de apareamiento, puede determinarse a diario el consumo de alimento. Tras el parto y durante la lactancia, se determinará el consumo de alimento (o de agua cuando la sustancia en estudio se administre en el agua de bebida) en los mismos días en que se pesen las camadas. Los machos y hembras P se pesarán el primer día de tratamiento, y luego semanalmente. Estas observaciones se anotarán por separado para cada animal adulto.

La duración de la gestación se calculará a partir del día 0 de gestación. Cada camada se examinará lo antes posible tras el alumbramiento para establecer el número y sexo de las crías, las nacidas muertas, las vivas y la presencia de anomalías macroscópicas.

Las crías muertas y las sacrificadas en el día 4 se conservarán y estudiarán en busca de posibles defectos. Se contarán las crías vivas y se pesarán las camadas la mañana siguiente al nacimiento, los días 4 y 7 siguientes y, por fin, semanalmente hasta la conclusión del estudio, momento en que debe pesarse por separado a los animales.

Se registrarán las anomalías físicas o de conducta observadas en las madres o su progenie.

*Patología*

Autopsia

Cuando los animales de la generación P se sacrifiquen, o si han muerto a lo largo del estudio, se examinarán al microscopio en busca de anomalías estructurales o alteraciones patológicas, prestando una atención especial a los órganos del sistema reproductor. Las crías muertas o moribundas se examinarán por si sufrieran malformaciones.

Examen histopatológico

Se conservarán para examen microscópico ovarios, útero, cérvix, vagina, testículos, epidídimos, vesículas seminales, próstata, glándula coagulante, hipófisis y órganos efectores de todos los animales P. En caso de que estos órganos no se hayan examinado en otros estudios con varias dosis, se estudiarán al microscopio en todos los animales con dosis máxima y en los controles y en los animales que mueran durante el estudio, siempre que sea posible.

Se examinarán entonces, en todos los demás animales P, los órganos que muestren anomalías en aquellos. En estos casos, se practicará examen microscópico de todos los tejidos que muestren alteraciones patológicas macroscópicas. Como se ha indicado al exponer los métodos de apareamiento, pueden someterse a examen microscópico los órganos reproductores de los animales que se sospeche sufren esterilidad.

▼B

2. **RESULTADOS**

Los resultados se resumirán en forma de tabla y mostrarán, para cada grupo de prueba, el número de animales al comienzo del ensayo, el de machos fértiles, el de hembras grávidas, los tipos de alteraciones y el porcentaje de animales que mostraban cada alteración,

Cuando sea posible, los resultados numéricos se enumerarán por un método estadístico apropiado. Puede usarse cualquier método estadístico reconocido.

3. **INFORME**

3.1.
DATOS DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— especie y cepa utilizada,

— datos de respuesta tóxica en función del sexo y la dosis, incluidos los índices de fertilidad, gestación y viabilidad,

— momento de la muerte durante el estudio, o indicación de que los animales sobrevivieron hasta el día previstopara el sacrificio al final del estudio,

— tabla en la que aparezcan los pesos de cada camada, los pesos medios de las crías y los pesos de las distintas crías tras concluir el estudio,

— efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie y el crecimiento postnatal,

— día de observación de cada signo anómalo y su evolución,

— datos de peso de los animales P,

— hallazgos de autopsia,

— descripción detallada de todos los hallazgos microscópicos,

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando proceda,

— comentario de los resultados,

— interpretación de los resultados.

3.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN

Véase la Introducción general, Parte B.

4. **REFERENCIAS**

Véase la Introducción general, Parte B.

▼B

## B.35. ESTUDIO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN EN DOS GENERACIONES

### 1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 416 (2001).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo de toxicidad para la reproducción en dos generaciones tiene por objeto proporcionar información general sobre los efectos de una sustancia de ensayo en la integridad y funcionamiento del aparato reproductor del macho y la hembra, en particular, la función gonadal, ciclo estrual, comportamiento relativo al apareamiento, concepción, gestación, parto, lactancia y destete, así como el desarrollo y crecimiento de la progenie. El estudio también puede mostrar los efectos de la sustancia de ensayo en la morbilidad y mortalidad neonatales, proporcionar datos preliminares sobre la toxicidad para el desarrollo prenatal y postnatal y servir de orientación para ensayos posteriores. Además de estudiar el desarrollo y crecimiento de la generación F1, el ensayo tiene por objeto evaluar la integridad y el funcionamiento del aparato reproductor del macho y la hembra, así como el desarrollo y crecimiento de la generación F2. Puede obtenerse mayor información sobre la toxicidad para el desarrollo y las deficiencias funcionales completando el presente protocolo mediante estudios descritos en los ensayos de toxicidad para el desarrollo y/o neurotoxicidad para el desarrollo, según proceda, o estudiando dichos aspectos de forma independiente empleando métodos de ensayo apropiados.

### 1.2. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra la sustancia de ensayo en dosis escalonadas a varios lotes de machos y hembras. En el caso de los machos de la generación P (generación parental), se administra a lo largo del crecimiento y al menos durante un ciclo de espermatogénesis completo (unos 56 días en el ratón y 70 en la rata) para poder observar los posibles efectos adversos sobre la espermatogénesis. Los efectos en el esperma se valoran mediante diversos parámetros (morfología y motilidad de los espermatozoides, etc.), preparaciones tisulares y análisis histopatológico exhaustivo. Si se dispone de datos relativos a la espermatogénesis obtenidos en estudios previos con dosis repetidas de duración suficiente (por ejemplo, 90 días), no será preciso incluir los machos de la generación P en la evaluación. No obstante, se recomienda conservar muestras o grabaciones digitales del esperma de esta generación para su posterior evaluación. La sustancia de ensayo se administra a las hembras de la generación P durante el crecimiento y a lo largo de varios ciclos estruales completos para detectar todos los efectos adversos en el ciclo estrual. Asimismo, se administra a los animales de la generación P durante el período de apareamiento y las gravideces resultantes hasta el destete de su descendencia (generación F1). Tras el destete, se sigue administrando la sustancia a la generación F1 durante todo el crecimiento, el período de apareamiento y el nacimiento de la generación F2, hasta el destete de esta última.

Se someten todos los animales a observación clínica y examen patológico para detectar signos de toxicidad. El examen tendrá por objeto principal evaluar los efectos sobre la integridad y el funcionamiento del aparato reproductor de las hembras y los machos y sobre el desarrollo y crecimiento de la descendencia.

▼B

1.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.3.1. **Selección de la especie animal**

La especie idónea para el ensayo es la rata. Si se emplea otra distinta, debe justificarse y procederse a las adaptaciones pertinentes. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías del desarrollo. Al principio del experimento, la variación ponderal de los animales empleados ha de ser mínima y no superar el ± 20 % del peso medio de cada sexo.

1.3.2. **Condiciones de alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3°) y con una humedad relativa mínima del 30 % y preferiblemente inferior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, si bien lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplica una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable a voluntad. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta.

Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Una vez comprobado el apareamiento, las hembras que se hayan apareado se colocarán en jaulas individuales preparadas para el parto y la maternidad. También pueden enjaularse en grupos reducidos y separarse uno o dos días antes del parto. Cuando se acerque la fecha de este, se les proporcionará material adecuado y determinado de nidificación.

1.3.3. **Preparación de los animales**

Deben emplearse animales jóvenes sanos, que se hayan mantenido al menos 5 días en las condiciones de laboratorio para su aclimatación y que no hayan sido sometidos a experimentos previos. Se caracteriza la especie, cepa, procedencia, sexo, peso y/o edad de los animales de experimentación. Es preciso conocer las relaciones de consanguinidad entre los animales para evitar el apareamiento entre hermanos. Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los de control (se recomienda agruparlos por niveles ponderales). Las jaulas se disponen de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se asigna a cada animal un número de identificación distinto. Los animales de la generación P deben numerarse antes de iniciar el tratamiento y los de la generación F1 que se seleccionen para el apareamiento, en el momento del destete. Debe registrarse la camada de origen de todos los animales de la generación F1 seleccionados. Además de ello, se recomienda identificar cada cría tan pronto como sea posible tras el nacimiento si se tiene intención de pesarlas por separado o someterlas a ensayos funcionales.

Los animales de la generación P han de tener entre 5 y 9 semanas de edad cuando se inicie el tratamiento. Los lotes de ensayo han de ser tan homogéneos como sea posible por lo que respecta al peso y edad de los animales.

▼B

1.4. PROCEDIMIENTO

1.4.1. **Número y sexo de los animales**

Cada lote de ensayo y de control debe estar integrado por una cantidad de animales que permita disponer de un mínimo de 20 hembras grávidas a término o casi. En el caso de las sustancias que provocan efectos indeseables (por ejemplo, esterilidad o toxicidad excesiva a la dosis más alta), puede resultar imposible. Se trata de obtener un número suficiente de hembras grávidas para realizar una evaluación significativa de los efectos de la sustancia de ensayo sobre la fertilidad, la gestación y el comportamiento materno, así como sobre la lactancia, desarrollo y crecimiento dé la descendencia F1 desde la concepción hasta la madurez, y sobre el desarrollo de la generación F2 hasta el destete. Por consiguiente, el hecho de no conseguir el número deseado de hembras grávidas (es decir, 20) no invalida necesariamente el estudio y debe valorarse caso por caso.

1.4.2. **Preparación de las dosis**

Se recomienda administrar la sustancia de ensayo por vía oral (con el alimento o el agua de bebida o por sonda), salvo que se considere más apropiado emplear otra vía (cutánea o inhalatoria).

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

1.4.3. **Posología**

Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un lote de control en paralelo. A menos que las características fisicoquímicas o las propiedades biológicas de la sustancia de ensayo impongan restricciones, la dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso. En caso de que se produzca un índice de mortalidad inesperado, si el correspondiente a la generación P es inferior al 10 % aproximadamente, el estudio sigue siendo aceptable. Se selecciona una serie de dosis decrecientes para poner de manifiesto las reacciones en función de la dosis y la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL). Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si la sustancia de ensayo se añade a los alimentos, el intervalo entre las dosis no debe superar un factor de 3. Las dosis deben establecerse tomando en consideración todos los datos disponibles sobre la toxicidad, en particular los resultados de los estudios de dosis repetidas, y la información complementaria relativa al metabolismo y la cinética de la sustancia de ensayo o productos afines. Dicha información servirá asimismo para justificar la pertinencia de la gama de dosis.

▼B

Se emplea un lote de control en paralelo, que no recibe la sustancia de ensayo, pero sí el vehículo en caso de que este se utilice para la sustancia. Salvo por lo que respecta a la administración de sustancia de ensayo, los animales del lote de control deben tratarse de la misma manera que los de los lotes de ensayo. En su caso, los lotes de control han de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos y provoca una disminución de la ingesta o asimilación, puede ser útil utilizar un lote de control alimentado en paralelo. En lugar de ello, pueden emplearse los resultados de estudios de control destinados a evaluar los efectos de la disminución del consumo de alimentos sobre los parámetros de la reproducción.

Debe prestarse atención a las siguientes características del vehículo u otros aditivos, según proceda: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia de ensayo, efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia de ensayo que puedan modificar su toxicidad y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o el estado nutricional de los animales.

1.4.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo con una sola dosis equivalente al menos a 1 000 mg/kg peso corporal/día, administrada por vía oral, o un porcentaje equivalente si se incorpora en los alimentos o el agua, y siguiendo el procedimiento descrito en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable en los padres ni en la progenie y si, a la luz de los datos disponibles (por ejemplo, sobre sustancias con características estructurales y/o metabólicas similares), no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con varias dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis oral superior. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo (solubilidad, etc.) las que determinan y limitan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse.

1.4.5. **Administración de las dosis**

La sustancia de ensayo se administra diariamente a los animales, los 7 días de la semana y preferiblemente por vía oral (con los alimentos o el agua de bebida o por sonda). En caso de emplearse otra vía, debe justificarse y efectuarse las modificaciones oportunas. Se utilizará la misma forma de administración para todos los animales durante el período experimental apropiado. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse con una sonda gástrica. El volumen máximo de líquido administrado de una sola vez no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal (0,4 ml/100 g de peso corporal en caso de que se emplee aceite de maíz como vehículo), salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis. En los ensayos en que se emplee sonda, en principio las crías reciben la sustancia de ensayo indirectamente a través de la leche materna hasta que se inicia la administración directa en el destete. En los estudios en que la sustancia de ensayo se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, las crías también la reciben directamente cuando empiezan a alimentarse solas en la última semana de lactancia.

▼B

Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren con la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (ppm) o bien una dosis constante respecto al peso corporal de los animales, pero debe indicarse qué método se ha elegido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse al menos una vez por semana para mantener una dosis constante respecto al peso corporal del animal. El ajuste deberá tener presente la difusión placentaria.

1.4.6. **Programa experimental**

La administración diaria de la sustancia de ensayo a los machos y las hembras de la generación P se inicia cuando tienen entre 5 y 9 semanas de edad y a los de la generación F1, en el destete. Debe tenerse presente que cuando la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, las crías de la generación F1 ya han estado expuestas directamente durante la lactancia. Se sigue administrando la sustancia a los animales de ambos sexos de las generaciones P y F1 al menos durante 10 semanas antes del período de apareamiento y durante las dos semanas de dicho período. Los machos que no vayan a emplearse para evaluar los efectos sobre la reproducción se sacrifican por métodos compasivos y se estudian. La sustancia de ensayo sigue administrándose a las hembras de la generación P durante la gestación y hasta el destete de su progenie F1. Puede ser oportuno modificar el programa de administración de las dosis a la luz de la información disponible sobre la sustancia de ensayo, en particular sobre la toxicidad, la inducción metabólica o la bioacumulación. Por lo general, la dosis que se administra a cada animal se calcula con arreglo a la última determinación del peso corporal, si bien conviene ser prudente al adaptar la dosis en el último período de la gestación.

Los machos y hembras de las generaciones P y F1 siguen recibiendo sustancia de ensayo hasta que sean sacrificados por métodos compasivos, cuando ya no sean necesarios para evaluar los efectos sobre la reproducción. Los descendientes F1 que no se seleccionen para el apareamiento y todos los descendientes F2 se sacrificarán por métodos compasivos después del destete.

1.4.7. **Apareamiento**

1.4.7.1. *Apareamiento de la generación parental (P)*

Para cada apareamiento, se juntan una hembra y un macho tratados con la misma dosis (apareamiento 1:1) hasta que se produzca la cópula o durante 2 semanas. Las hembras se observan todos los días para detectar la presencia de esperma o tapón vaginal. El día 0 de la gestación es el día en que se observa un tapón vaginal o la presencia de esperma. Si no se produce apareamiento, puede plantearse otro intento con hembras y machos de comprobada capacidad reproductora del mismo lote. Las parejas deben quedar claramente identificadas en los resultados. Debe evitarse el apareamiento entre animales hermanos.

▼B

1.4.7.2. *Apareamiento de la generación F1*

Se seleccionan al menos un macho y una hembra de cada camada de la generación F1 en el momento del destete con objeto de aparearlos con otras crías tratadas con la misma dosis, pero pertenecientes a otra camada, para obtener la generación F2. La selección de las crías de la misma camada debe hacerse al azar si no presentan diferencias significativas de peso corporal ni de aspecto. Si se observan diferencias, se seleccionan los mejores ejemplares de cada camada. Desde el punto de vista pragmático, resulta más fácil seleccionarlos en función del peso corporal, si bien puede estar más indicado basarse en el aspecto. Los descendientes F1 no deben aparearse antes de alcanzar la plena madurez sexual.

Las parejas sin descendencia deben estudiarse con objeto de determinar la causa aparente de infertilidad. Para ello, puede dárseles otras oportunidades de aparearse con machos o hembras de comprobada capacidad reproductora, efectuarse el examen microscópico de los órganos reproductores o estudiarse los ciclos estruales o la espermatogénesis.

1.4.7.3. *Segundo apareamiento*

En algunos casos, en particular cuando las dimensiones de la camada se ven modificadas por el tratamiento o cuando se observa un efecto equívoco en el primer apareamiento, se recomienda volver a aparear los adultos P o F1 para obtener una segunda camada. Conviene volver a aparear las hembras o machos que no hayan engendrado con un reproductor o reproductora de capacidad comprobada. Si se considera necesaria una segunda camada de alguna de las generaciones, los animales deben aparearse más o menos una semana después del destete de la primera camada.

1.4.7.4. *Dimensión de la camada*

Se deja que los animales paran y críen con normalidad a su progenie hasta el destete. La normalización de la dimensión de las camadas es facultativa. Si se lleva a cabo, debe describirse detalladamente el método empleado.

1.5. OBSERVACIONES

1.5.1. **Observaciones clínicas**

Debe hacerse una observación clínica general una vez al día y, en caso de administración por sonda, teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registran los cambios en el comportamiento, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad. Además de ello, al menos una vez por semana se examinan todos los animales de forma más exhaustiva; puede hacerse coincidiendo con los días en que se pesen los animales. Se examinan todos los animales dos veces al día y una vez al día durante los fines de semana, según proceda, para detectar signos de morbilidad y mortalidad.

▼B

1.5.2. **Peso corporal y consumo de alimentos y agua de los animales parentales**

Los animales de las generaciones P y F1 deben pesarse el día de la primera administración y a continuación al menos una vez por semana. Las madres (P y F1) se pesan, al menos, los días 0, 7, 14 y 20 o 21 de la gestación; durante la lactancia, los mismos días en que se pesen las crías y, por último, el día del sacrificio. Los resultados se registran para cada animal adulto por separado. Durante el período previo al apareamiento y durante la gestación, se mide al menos una vez por semana el consumo de alimentos. Si la sustancia de ensayo se administra con el agua, el consumo de esta se mide al menos una vez por semana.

1.5.3. **Ciclo estrual**

Se estudia la duración y normalidad del ciclo estrual en las hembras P y F1 mediante frotis vaginales antes del apareamiento y, con carácter facultativo, durante este, hasta que se compruebe que ha habido apareamiento. La toma de células vaginales o cervicales ha de hacerse con cuidado para no dañar la mucosa y evitar una pseudogestación (1).

1.5.4. **Parámetros de evaluación del esperma**

Se registra el peso de los testículos y epidídimos de todos los machos P y F1 tras el sacrificio y se conserva un ejemplar de cada órgano para el examen histopatológico (véanse los apartados 1.5.7 y 1.5.8.1). Se conservan los testículos y epidídimos restantes de un sublote integrado al menos por 10 machos de cada grupo de machos P y F1, para contar las espermátides resistentes a la homogeneización y los espermatozoos almacenados en la cola del epidídimo, respectivamente. En ese mismo sublote de machos, se recoge el contenido de la cola del epidídimo o el conducto deferente para evaluar la motilidad y morfología de los espermatozoides. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento o los resultados de otros estudios ponen de manifiesto que la sustancia de ensayo puede afectar a la espermatogénesis, debe efectuarse la evaluación del esperma en todos los machos de cada lote tratado; en caso contrario, el recuento puede limitarse a los machos P y F1 del lote de control y los lotes tratados con la dosis superior.

Debe contarse la totalidad de las espermátides testiculares resistentes a la homogeneización y los espermatozoos de la cola del epidídimo (2) (3). La reserva caudal de espermatozoos puede deducirse de la concentración y el volumen presentes en la suspensión utilizada para completar las evaluaciones cualitativas y de la cantidad de espermatozoos recuperados tras triturar u homogeneizar el tejido caudal restante. El recuento debe efectuarse inmediatamente después del sacrificio, en el sublote de machos seleccionados en los grupos tratados con las distintas dosis, salvo que se realicen grabaciones digitales o de vídeo, o se congelen las muestras para su posterior análisis. En estos casos pueden analizarse en primer lugar el lote de control y el tratado con la dosis más alta y, si no se observan efectos relacionados con el tratamiento (por ejemplo, en la cantidad, motilidad o morfología de los espermatozoides), no es preciso analizar los demás lotes. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento en el lote tratado con la dosis más alta, deberán someterse a análisis los lotes tratados con dosis inferiores.

▼B

Debe evaluarse o grabarse en soporte de vídeo inmediatamente después del sacrificio la motilidad de los espermatozoides en el epidídimo o el conducto deferente. Se toma una muestra de esperma evitando al máximo dañar los tejidos y se diluye para estudiar la motilidad mediante métodos aceptables (4). El porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles se determina de forma objetiva o subjetiva. Si se realiza un análisis de la motilidad asistido por ordenador (5) (6) (7) (8) (9) (10), la motilidad progresiva se evalúa con arreglo a umbrales de velocidad media de trayectoria y movimiento en línea recta o índice lineal, definidos por el usuario. Si las muestras se graban en vídeo (11) o se graban las imágenes de otra manera en el momento de la autopsia, el análisis posterior puede limitarse a los machos P y F1 del lote de control y del tratado con la dosis más alta, salvo que se hayan observado efectos relacionados con el tratamiento, en cuyo caso habrá que evaluar asimismo los lotes tratados con dosis inferiores. Si no se dispone de imágenes de vídeo ni digitales, se analizarán en la autopsia todas las muestras de todos los lotes tratados.

Se llevará a cabo el análisis morfológico de una muestra de esperma del epidídimo o el conducto deferente. Los espermatozoides (al menos 200 por muestra) se fijan y analizan en preparaciones húmedas (12), y se clasifican entre normales o anómalos. Las anomalías morfológicas de los espermatozoides incluyen las fusiones, las cabezas aisladas y las cabezas o las colas deformadas. La evaluación ha de efectuarse en el sublote de machos seleccionados de los grupos tratados con las distintas dosis, inmediatamente después del sacrificio o posteriormente a partir de grabaciones de vídeo o digitales. Una vez fijados, los frotis también pueden analizarse en un momento posterior. En estos casos pueden analizarse en primer lugar el lote de control y el tratado con la dosis más alta y, si no se observan efectos relacionados con el tratamiento (sobre la morfología de los espermatozoides, por ejemplo), no es preciso analizar los demás lotes. Si se observan efectos relacionados con el tratamiento en el lote tratado con la dosis más alta, deberán someterse a análisis los lotes tratados con dosis inferiores.

Si alguno de los parámetros mencionados de evaluación del esperma ya ha sido analizado en un estudio de toxicidad sistémica de 90 días al menos, no es necesario repetir el análisis en el estudio de la toxicidad en dos generaciones. Se recomienda, no obstante, conservar muestras o grabaciones digitales del esperma de la generación P para poder repetir la evaluación, si fuera necesario.

1.5.5. **Descendencia**

Se examinan todas las camadas lo antes posible después del parto (día 0 de la lactancia) para determinar el número y sexo de las crías, la mortinatalidad, el número de nacidos vivos y la presencia de anomalías macroscópicas. Es preferible examinar las crías halladas muertas el día 0, si no están maceradas, para detectar posibles anomalías y determinar la causa de la muerte y, a continuación, conservarlas. Las crías vivas se cuentan y pesan por separado al nacer (día 0 de la lactancia) o el día 1 y luego de forma periódica (por ejemplo, los días 4, 7, 14 y 21 de la lactancia). Se registran las anomalías físicas y las alteraciones del comportamiento de las madres y las crías.

▼B

Se registra el desarrollo físico de la progenie, anotando la ganancia de peso corporal. Otros parámetros físicos (apertura de las orejas y los ojos, erupción de dientes, crecimiento del pelo, etc.) pueden proporcionar información adicional, si bien es preferible emplear esos datos para evaluar la madurez sexual (edad y peso corporal en el momento de la apertura de la vagina o la separación balanoprepucial, etc.) (13). Si no forma parte de otros estudios, se recomienda efectuar la valoración funcional (actividad motriz, funciones sensoriales, ontogenia de los reflejos, por ejemplo) de la progenie F1 antes y/o después del destete, sobre todo por lo que respecta a la maduración sexual. En los descendientes F1 recién destetados y seleccionados para el apareamiento debe determinarse la edad a la que se produzca la apertura de la vagina y la separación balanoprepucial. Si se observa una alteración de la proporción de machos y hembras o de la edad de maduración sexual en la generación F1, debe medirse la distancia anogenital en las crías F2 el día del nacimiento.

Las observaciones funcionales no son obligatorias en los lotes que presenten signos evidentes de toxicidad (disminución significativa de la ganancia de peso, etc.). Si se efectúan exploraciones funcionales, se harán en las crías que no se hayan seleccionado para el apareamiento.

1.5.6. **Autopsia macroscópica**

Justo después del sacrificio o la muerte ocurrida durante el estudio, se someten a examen macroscópico para detectar toda anomalía estructural o cambio patológico todos los animales parentales (P y F1), todas las crías que presenten anomalías externas o signos clínicos y una cría seleccionada al azar de cada sexo y camada de las generaciones F1 y F2. Se prestará especial atención a los órganos reproductores. Deben examinarse y conservarse las crías moribundas que se sacrifiquen por métodos compasivos y las crías muertas, si no están maceradas, para detectar posibles anomalías y establecer la causa de la muerte.

Debe procederse al examen de los úteros de todas las hembras primíparas, sin comprometer la evaluación histopatológica, para detectar la presencia de puntos de implantación y contarlos.

1.5.7. **Pesaje de los órganos**

Tras el sacrificio, se determina el peso corporal de todos los animales parentales P y F1, así como el de los órganos siguientes (los órganos pares se pesarán por separado):

— utero y ovarios,

— testículos y epidídimos (enteros y colas),

— próstata,

— vesículas seminales con glándulas coagulantes y sus líquidos, y próstata (conjunto),

— cerebro, hígado, riñones, bazo, hipófisis, glándula tiroides, glándulas suprarrenales y órganos diana conocidos.

Se determina el peso corporal de las crías F1 y F2 sacrificadas que se hayan seleccionado para la autopsia, así como el peso del cerebro, bazo y timo de una cría seleccionada al azar de cada sexo y camada (véase el apartado 1.5.6).

▼B

Si es posible, los resultados de la autopsia macroscópica y del pesaje de órganos se interpretan a la luz de las observaciones realizadas en otros estudios con dosis repetidas.

1.5.8. **Histopatología**

1.5.8.1. *Animales parentales*

Los siguientes órganos y tejidos de los animales parentales (P y F1), o muestras representativas de estos, se fijan y conservan en un medio apropiado con vistas al examen histopatológico:

— vagina, útero con cuello, y ovarios (conservados en un fijador apropiado),

— un testículo (conservado en líquido de Bouin o un fijador comparable), un epidídimo, las vesículas seminales, la próstata y una glándula coagulante,

— órgano u órganos diana previamente identificados de todos los animales P y F1 seleccionados para el apareamiento.

Debe realizarse un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos antes mencionados de todos los animales P y F1 del lote de control y el lote tratado con la dosis más alta, que se hayan seleccionado para el apareamiento. El examen de los ovarios de las hembras P es facultativo. Deben examinarse, asimismo, los órganos que presenten alteraciones relacionadas con el tratamiento en los lotes tratados con las dosis inferior y media, con objeto de facilitar la determinación de la NOAEL. Además de ello, se someterán a evaluación histopatológica los órganos reproductores de los animales tratados con las dosis inferior y media, en los que se sospeche una disminución de la fertilidad, por ejemplo, los que no se hayan apareado, no hayan concebido, no hayan engendrado o no hayan tenido una progenie sana, o en los que se hayan observado alteraciones del ciclo estrual o de la cantidad, motilidad o morfología de los espermatozoides. Se examinarán todas las lesiones macroscópicas como atrofias o tumores.

Debe efectuarse un examen histopatológico pormenorizado de los testículos (por ejemplo, con líquido de Bouin, inclusión en parafina y cortes transversales de 4-5μm de espesor) para poner de manifiesto los efectos relacionados con el tratamiento como la retención de espermátides, la ausencia de algunas capas o tipos de células germinales, la presencia de células gigantes plurinucleadas o el desprendimiento de células espermatogénicas a la luz de los túbulos seminíferos (14). El examen del epidídimo intacto ha de abarcar la cabeza, el cuerpo y la cola, y puede efectuarse en una sección longitudinal. Se analiza el epidídimo para ver si hay infiltración leucocitaria, cambios en la frecuencia de los tipos celulares, células aberrantes y fagocitosis de espermatozoides. El análisis de los órganos reproductores de los machos puede realizarse mediante coloración con PAS o hematoxilina.

Tras la lactancia, el ovario debe contener folículos primordiales, folículos en crecimiento y grandes cuerpos amarillos de la lactancia. El examen histopatológico debe poner de manifiesto la depleción cualitativa de la población de folículos primordiales. Debe efectuarse una evaluación cuantitativa de los folículos primordiales de las hembras F1; el número de animales, la elección de la sección ovárica y el tamaño de las muestras de secciones han de ser válidas desde el punto de vista estadístico para el método de evaluación empleado. En el examen debe hacerse el recuento de los folículos primordiales, que pueden estar combinados con pequeños folículos en crecimiento, para efectuar la comparación de los ovarios de las hembras de los lotes tratados y del de control (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. Crías destetadas

Se fijan y conservan en un medio adecuado para el posterior examen histopatológico los tejidos que presenten anomalías macroscópicas y los órganos diana de todas las crías que presenten anomalías externas o signos clínicos, así como de la cría seleccionada al azar de cada sexo y camada de las generaciones F1 y F2, que no haya sido seleccionada para el apareamiento. La descripción histopatológica completa de los tejidos conservados se centrará sobre todo en los órganos reproductores.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal por separado y resumirse en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo y cada generación, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio compasivo, el número de animales fértiles, el número de hembras grávidas, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de observaciones de los animales parentales y las crías, los tipos de cambios histopatológicos y todos los datos pertinentes sobre la camada.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La elección de los métodos estadísticos debe efectuarse en la fase de diseño del estudio y justificarse. Los modelos estadísticos aplicables a las relaciones dosis-respuesta pueden resultar útiles para analizar los resultados. El informe debe recoger información suficiente sobre el método y el programa informático empleados, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluar y reconstruir el análisis.

2.2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones deben evaluarse respecto a los efectos observados, en particular en la autopsia y los exámenes microscópicos. La evaluación debe referirse a la relación, o la ausencia de relación, entre la dosis de sustancia de ensayo y la presencia o ausencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluyendo lesiones macroscópicas, órganos diana identificados, alteración de la fertilidad, anomalías clínicas, alteración de la capacidad de reproducción y del rendimiento de la camada, cambios del peso corporal, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico. Los resultados del estudio han de interpretarse teniendo presentes las propiedades fisicoquímicas de la sustancia de ensayo y, en su caso, los datos toxicocinéticos.

Un ensayo de toxicidad para la reproducción correctamente realizado debe proporcionar una estimación satisfactoria de la dosis sin efecto y poner de manifiesto los efectos adversos sobre la reproducción, el parto, la lactancia y el desarrollo postnatal, en particular el crecimiento y la maduración sexual.

▼B

2.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones proporciona información sobre los efectos de la exposición repetida a una sustancia durante todas las fases del ciclo de reproducción y, en particular, sobre los parámetros de la reproducción y el desarrollo, crecimiento, maduración y supervivencia de la descendencia. Los resultados del estudio han de interpretarse a la luz de los de los estudios subcrónicos, de desarrollo prenatal, toxicocinéticos y de otro tipo. Los resultados del presente estudio pueden servir para valorar la necesidad de realizar más ensayos con una sustancia química. La validez de la extrapolación de los resultados del estudio al hombre es limitada. Resultan más útiles para determinar las dosis sin efecto y el grado de exposición humana aceptable (20) (21) (22) (23).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas,

— identificación,

— pureza.

Vehículo (si procede):

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

**Animales sometidos a ensayo:**

— especie y cepa empleada,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, material de nidificación, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

**Condiciones de ensayo:**

— justificación de la elección de las dosis,

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos y concentración obtenida,

— estabilidad y homogeneidad del preparado,

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

▼B

Resultados:

— consumo de alimentos y agua, si se ha medido, rendimiento alimentario (ganancia de peso corporal por gramo de alimentos consumidos) y sustancia de ensayo consumida por los animales P y F1, salvo durante el período de cohabitación y, al menos, el último tercio de la lactancia,

— datos relativos a la absorción (si procede),

— peso corporal de los animales P y F1 seleccionados para el apareamiento,

— datos sobre las camadas y peso de las crías,

— peso corporal en el momento del sacrificio y peso absoluto y relativo de los órganos de los animales parentales,

— naturaleza, gravedad y duración de los signos clínicos (reversibles o no),

— fecha de las muertes sobrevenidas durante el ensayo y animales que han sobrevivido hasta el sacrificio,

— reacción tóxica por sexo y dosis, incluidos los índices de apareamiento, fecundidad, gestación, natalidad, viabilidad y lactancia; el informe debe mencionar las cifras empleadas para calcular los índices,

— efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la progenie, el crecimiento postnatal, etc.,

— hallazgos de la autopsia,

— descripción detallada de todos los hallazgos histopatológicos,

— número de hembras P y F1 con ciclos normales y duración del ciclo,

— número total de espermatozoides en la cola del epidídimo, porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles, porcentaje de espermatozoides de morfología normal y porcentaje de espermatozoides por anomalía detectada,

— tiempo transcurrido hasta el apareamiento, expresado en días,

— duración de la gestación,

— número de implantaciones, cuerpos amarillos, dimensión de la camada,

— número de nacidos vivos y de pérdidas postimplantatorias,

— número de crías con anomalías macroscópicas y número de crías retrasadas, si se ha determinado,

— parámetros físicos evaluados en las crías y otros datos relativos al desarrollo postnatal; los parámetros físicos evaluados han de justificarse,

— observaciones funcionales realizadas en las crías y los adultos, según proceda,

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede,

▼B

Discusión de los resultados,

Conclusiones, incluida la NOAEL en la madre y la progenie.

4. **REFERENCIAS**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, En: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-lnduced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92-108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103-107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39 44.

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237- 244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267-273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In *Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409-421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449-458.

(9) Slott, V.L. y Perreault, S.D. (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. En: *Methods in Toxicology,* Part A., Academic, Orlando, Florida, pp. 319-333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401-415.

(11) Working, P.K. y M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8:330-337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6:491-505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17:298303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. y R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarían Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarían Toxicity. En: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421-426.

(17) Manson, J.M. y Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. En: Principies and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, BJ. et al. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5:379-383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. En: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J.A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. En: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. y E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. En: Principies and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). En: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

## B.36. **TOXICOCINÉTICA**

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 417 de la OCDE (2010). Se realizan estudios para investigar la toxicocinética de una sustancia problema a fin de obtener la debida información sobre su absorción, distribución, biotransformación (metabolismo) y excreción, relacionar la concentración o la dosis con la toxicidad observada y llegar a comprender los mecanismos toxicológicos. La toxicocinética puede ayudar a entender mejor los estudios toxicológicos demostrando que los animales de experimentación están expuestos de manera sistémica a la sustancia problema y revelando cuáles son las fracciones circulantes (la sustancia original o sus metabolitos). Los parámetros toxicocinéticos básicos que se determinan en estos estudios indican además la capacidad de acumulación de la sustancia problema en los tejidos y órganos, así como el potencial de inducción metabólica tras la exposición a dicha sustancia.

2. Los datos toxicocinéticos pueden ayudar a determinar la idoneidad y relevancia de extrapolar los datos de toxicidad animal a la evaluación del riesgo y/o del peligro para la especie humana. Por otro lado, los estudios toxicocinéticos pueden aportar información muy útil para determinar los niveles posológicos en los estudios de toxicidad (cinética lineal y no lineal), los efectos de la vía de administración, la biodisponibilidad y otras cuestiones relacionadas con el diseño experimental. Algunos de estos datos pueden servir de ayuda en el desarrollo de un modelo toxicocinético basado en la fisiología (PBTK).

3. Los datos toxicocinéticos y de los metabolitos tienen aplicaciones importantes en la medida en que indican posibles toxicidades y modos de acción, así como su relación con el nivel de dosis y la vía de exposición. Además, los datos sobre el metabolismo resultan útiles para evaluar la importancia toxicológica de la exposición a metabolitos de la sustancia problema que son de origen exógeno.

4. Una información toxicocinética adecuada será de ayuda para respaldar la mayor aceptabilidad y aplicabilidad de los modelos de relación estructura-actividad cuantitativa o de extrapolación o agrupación estructural cuando se pretende evaluar la seguridad de la sustancias. Finalmente, los datos cinéticos pueden servir para evaluar la importancia toxicológica de otras investigaciones (*in vivo*/*in vitro*).

5. Mientras no se mencione otra vía de administración (véanse en particular los puntos 74 a 78), el presente método de ensayo es aplicable a la administración oral de la sustancia problema.

### CONSIDERACIONES INICIALES

6. Los sistemas normativos imponen diferentes requisitos y necesidades en torno a los criterios de valoración y parámetros que se usan para evaluar la toxicocinética de las diferentes clases de productos químicos (plaguicidas, biocidas, productos químicos industriales, etc.). Contra la que es habitual, este método de ensayo describe el estudio de la toxicocinética, que abarca múltiples determinaciones y criterios de valoración. En el futuro se podrán desarrollar distintos métodos de ensayo y/o documentos de orientación para describir cada criterio de valoración detenidamente y por separado. En la aplicación del presente método de ensayo, los análisis y evaluaciones que se lleven a cabo quedarán especificados por los requisitos y las necesidades de cada sistema normativo en particular.

▼M4

7. Son numerosos los estudios que se podrían realizar para evaluar el comportamiento toxicocinético de una sustancia problema dentro de un marco regulador. Dependiendo de las situaciones o necesidades normativas concretas, sin embargo, no tiene por qué ser obligatorio efectuar todos los estudios posibles para la evaluación de una sustancia. En el diseño de los estudios toxicocinéticos es importante la flexibilidad para tomar en consideración las características de la sustancia química que se pretende estudiar. En algunos casos solo habrá que investigar algunos aspectos determinados para hacer una valoración del riesgo y del peligro asociados a la sustancia problema. En algunas situaciones, se pueden recopilar los datos toxicocinéticos como parte de la evaluación de otros estudios toxicológicos. En otros casos serán necesarios estudios toxicocinéticos complementarios y más exhaustivos, en función de las necesidades normativas o de que surjan nuevos interrogantes al evaluar la sustancia problema.

8. Antes de comenzar el estudio y con el fin de mejorar su calidad y minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de ensayo tendrá en cuenta toda la información disponible acerca de la sustancia problema y de sus principales metabolitos y análogos, en la que pueden incluirse datos de otros métodos de ensayo pertinentes (estudios *in vivo* e *in vitro,* o evaluaciones *in silico*). En la planificación del estudio y la interpretación de sus resultados pueden ser de ayuda las propiedades fisicoquímicas, como el coeficiente de partición octanol-agua (expresado como log $P_{OW}$), el pKa, la hidrosolubilidad, la presión de vapor, y el peso molecular de la sustancia química. Estas propiedades se pueden determinar con los procedimientos adecuados que se describen en los correspondientes métodos de ensayo.

LIMITACIONES

9. El presente método de ensayo no ha sido diseñado para contemplar circunstancias especiales, como es el caso de las hembras grávidas o lactantes y de su progenie, ni para evaluar los residuos potenciales en los animales productores de alimentos que han estado expuestos. Sin embargo, los datos obtenidos de un estudio B.36 pueden aportar una valiosa información de base para el diseño de investigaciones específicas en este sentido. El presente método de ensayo no está destinado a la investigación de nanomateriales. El informe de una revisión preliminar de las directrices de ensayo (TG) de la OCDE para determinar su aplicabilidad a los nanomateriales indica que la TG 417 (equivalente a este método de ensayo B.36) no siempre es aplicable a los nanomateriales (1).

DEFINICIONES

10. Las definiciones de términos relacionados con este método de ensayo se pueden consultar en el apéndice.

CONSIDERACIONES SOBRE EL BIENESTAR ANIMAL

11. Se ofrecen indicaciones sobre el trato compasivo de los animales en el documento de orientación (GD) nº 19 de la OCDE (2). Se recomienda consultar dicho GD en relación con todos los estudios *in vivo* e *in vitro* descritos en este método de ensayo.

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

**Estudios piloto**

12. Se recomienda y se insta a realizar estudios piloto para la selección de los parámetros experimentales de los estudios toxicocinéticos (metabolismo, balance de masas, procedimientos analíticos, determinación del intervalo de dosis, exhalación de $CO_2$, etc.). La caracterización de algunos de estos parámetros puede no necesitar el uso de sustancias marcadas radiactivamente.

▼M4

**Selección de los animales**

*Especie*

13. La especie animal (y cepa) empleada en la investigación toxicocinética será, preferiblemente, la misma que en otros estudios toxicológicos efectuados con la sustancia química de interés. Normalmente se prefiere la rata, por cuanto se utiliza ampliamente en los estudios toxicológicos. El uso complementario de otras especies puede estar justificado si los estudios críticos de toxicología aportan pruebas de toxicidad importante en estas especies, o si la toxicidad/toxicocinética en estas resulta más relevante para la especie humana. Se justificará la elección de la especie animal y de la cepa.

14. Mientras no se indique lo contrario, el presente método de ensayo se refiere a la rata como especie experimental. Si se usan otras especies experimentales es posible que deban modificarse determinados aspectos metodológicos.

*Edad y cepa*

15. Se escogerán animales adultos jóvenes y sanos (normalmente de 6-12 semanas en el momento de la administración; véanse también los puntos 13 y 14). Se justificará el uso de animales que no sean adultos jóvenes. Todos los animales deben tener edades parecidas al principio del estudio. El peso de los animales no debe diferir en un porcentaje superior a ± 20 % del valor medio del grupo experimental. Idealmente, la cepa empleada debe ser la misma que se haya usado para obtener la base de datos toxicológicos de la sustancia problema.

*Número y sexo de los animales*

16. Por cada nivel de dosis investigado se emplearán como mínimo cuatro animales de un sexo. Se justificará la elección del sexo de los animales empleados. Se planteará usar animales de ambos sexos (4 machos y 4 hembras) si hay indicios para sospechar variaciones importantes de la toxicidad en función del sexo.

*Alojamiento y alimentación*

17. Como norma, los animales deben ser enjaulados de manera individual durante el período de estudio. El enjaulamiento en grupo puede estar justificado en circunstancias especiales. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La sala de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C) y a una humedad relativa del 30-70 %. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

**Sustancia problema**

18. Se utilizará una sustancia química marcada radiactivamente con $^{14}C$ para investigar todos los aspectos del estudio relacionados con el balance de masas y la identificación de los metabolitos; ahora bien, si se puede demostrar que:

— es posible evaluar adecuadamente el balance de masas y la identificación de los metabolitos empleando la sustancia problema sin marcar,

— la especificidad y sensibilidad analíticas del método usado con la sustancia problema no radiactiva son iguales o superiores a las que se obtendrían con la sustancia química radiomarcada,

▼M4

entonces no será necesario marcar radiactivamente la sustancia problema. Por lo demás, se pueden usar otros isótopos radiactivos y estables, particularmente si son responsables o forman parte de la fracción tóxica de la sustancia problema. Cuando sea posible, el marcador radiactivo se ubicará en una fracción nuclear de la molécula metabólicamente estable (no intercambiable, no eliminada metabólicamente en forma de $CO_2$ y que no pase a formar parte de la reserva de moléculas de un solo átomo de carbono del organismo). Puede ser necesario el radiomarcado de distintos sitios o regiones específicas de la molécula para seguir el destino metabólico de la sustancia problema.

19. Las sustancias problema, radiomarcadas o no, se analizarán con los métodos adecuados para establecer su pureza y su identidad. La pureza radiactiva de la sustancia problema radiomarcada debe ser la máxima posible para esa sustancia en particular (lo ideal es que supere el 95 %) y se procurará por todos los medios identificar los niveles de impurezas del 2 % o superiores. Se documentarán la pureza, la identidad y los porcentajes de impurezas que se hayan detectado. Cada marco regulador podrá proporcionar más indicaciones que orienten en la definición y las especificaciones de las sustancias que son mezclas, así como en la elección de métodos para la determinación de la pureza.

**Selección de la dosis**

*Estudio piloto*

20. Generalmente es suficiente una dosis oral única para realizar el estudio piloto. La dosis debe ser atóxica, pero lo bastante elevada para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma) y el cumplimiento de la finalidad enunciada del estudio piloto, según se expone en el punto 12 del presente método de ensayo.

*Estudios principales*

21. En los estudios principales se prefiere usar como mínimo dos dosis, por cuanto la información derivada de al menos dos grupos posológicos permite establecer los niveles de dosis en otros estudios de toxicidad y contribuye a evaluar la relación dosis-respuesta observada en los estudios de toxicidad previos.

22. Cuando se administran dos dosis, ambas deben ser lo bastante elevadas para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma). En la selección de las dosis se tendrá en cuenta la información de los estudios de toxicidad previos. Cuando no se disponga de tal información (de estudios de toxicidad oral aguda que hayan documentado los signos clínicos de toxicidad, o de estudios de administración continuada), se podrá considerar para la dosis más elevada un valor por debajo de la $DL_{50}$ (por las vías oral y cutánea) o la $CL_{50}$ (por inhalación) estimadas, o bien por debajo del límite inferior del intervalo de toxicidad aguda estimado. La dosis más baja será una fracción de la más elevada.

23. Cuando solo se investiga una dosis, lo ideal es que sea lo bastante elevada para permitir la identificación de los metabolitos en las excretas (y, si procede, en el plasma) sin provocar toxicidad aparente. Se justificarán los motivos de no incluir un segundo nivel posológico.

24. Cuando sea necesario establecer el efecto de la posología sobre los procesos cinéticos, puede ser que no basten dos dosis, y al menos una de ellas será lo bastante elevada para saturar dichos procesos. Si el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC) no es lineal entre dos niveles de dosis empleados en el estudio principal, ello indica con bastante certeza que se está produciendo la saturación de uno o más procesos cinéticos en algún punto entre los dos niveles de dosificación.

▼M4

25. Cuando la sustancia problema posea escasa toxicidad, se empleará una dosis máxima de 1 000 mg/kg peso corporal por las vías oral y cutánea (si la vía es inhalatoria, consúltese el capítulo B.2 del presente anexo; típicamente, esta dosis no debe superar los 2 mg/l). En función de las necesidades normativas y de las características específicas de la sustancia, puede hacer falta una dosis más elevada. Se justificará siempre la selección de la dosis.

26. La toxicocinética de dosis única y los datos de distribución en los tejidos pueden ser suficientes para determinar el potencial de acumulación y de persistencia. Sin embargo, en algunas circunstancias se requiere la administración de dosis repetidas: 1) para investigar mejor el potencial de acumulación y de persistencia o los cambios de toxicocinética (caso de la inducción o inhibición enzimáticas), o 2) cuando así lo exige el marco regulador de aplicación. En los estudios de administración continuada, si bien suele bastar con la administración continuada de dosis bajas, determinadas circunstancias imponen además la administración continuada de dosis elevadas (véase también el punto 57).

**Administración de la sustancia problema**

27. La sustancia problema se debe disolver o suspender de manera homogénea en el mismo vehículo que se haya empleado en los estudios de toxicidad oral con administración por sonda gástrica, si se dispone de esa información. Se justificará la elección del vehículo. En el diseño del estudio se tendrán en cuenta la elección del vehículo y el volumen de administración. El método habitual de administración es por sonda gástrica; no obstante, en determinadas situaciones puede resultar ventajosa la administración del producto en una cápsula de gelatina o mezclado con el alimento (se justificará en ambos casos). Se documentará la verificación de la dosis real que se administra a cada animal.

28. El volumen máximo de líquido que se puede administrar de una vez por sonda gástrica depende del tamaño de los animales experimentales, del tipo de vehículo y de si se priva a los animales de alimento antes de administrarles la sustancia problema. Se justificarán los motivos de alimentar a los animales o de restringir la comida antes de administrar la dosis. Normalmente, el volumen será lo más bajo posible, se trate de vehículos acuosos o no. En el caso de los roedores, el volumen de administración no debe exceder generalmente de 10 ml/kg peso corporal. Cuando se trata de sustancias químicas más lipófilas, el volumen de vehículo puede ser en principio de 4 ml/kg peso corporal. Si la administración es continuada, de modo que esté contraindicado el ayuno diario, se contemplará un volumen menor de administración (2-4 ml/kg peso corporal). Siempre que sea posible se procurará utilizar un volumen de dosis coherente con el administrado en otros estudios realizados con la misma sustancia introducida por sonda gástrica.

29. Con el fin de establecer la biodisponibilidad o la absorción oral relativa, se puede recurrir a la administración intravenosa (i.v.) de la sustancia problema y a la determinación de sus concentraciones en la sangre o las excretas. En el estudio i.v. se administra, en un vehículo adecuado, una dosis única (que suele ser equivalente pero no superior a la dosis oral más baja; véase la selección de la dosis) de la sustancia problema. El producto se administrará en un volumen adecuado (por ejemplo, 1 ml/kg peso corporal), en el lugar de aplicación establecido, como mínimo a 4 animales del sexo seleccionado para la investigación (pueden ser ambos sexos, siempre que se justifique; véase el punto 16). Para la administración i.v. de la sustancia problema se requiere la suspensión o disolución completa de la dosis preparada. El vehículo de la administración i.v. no debe afectar a la circulación ni a la

▼M4

integridad de la sangre. Si la sustancia problema se administra en infusión, se documentará la velocidad de la misma y se normalizará en todos los animales siempre y cuando se emplee una bomba. Se empleará anestesia cuando se vaya a canular (ya sea para la administración de la sustancia química o para tomar muestras de sangre) la vena yugular o la arteria femoral. Se considerará detenidamente el tipo de anestesia usado, ya que puede influir en la toxicocinética. Se permitirá a los animales recuperarse debidamente antes de administrarles la sustancia problema y el vehículo.

30. Con determinadas sustancias se pueden emplear otras vías de administración, como la cutánea o la inhalatoria (véanse los puntos 74-78), dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas y del uso o del grado de exposición humana previsibles.

**Mediciones**

*Balance de masas*

31. El balance de masas viene determinado por la suma del porcentaje de la dosis (radiactiva) administrada que se excreta en la orina, las heces y el aire espirado y el porcentaje que está presente en los tejidos, el resto del cuerpo y los líquidos de lavado de la jaula (véase el punto 46). En general se considera aceptable una recuperación total de la dosis (radiactiva) administrada > 90 %.

*Absorción*

32. Es posible hacer una estimación inicial de la absorción excluyendo del balance de masas el porcentaje de la dosis presente en el aparato digestivo y/o en las heces. En el punto 33 se puede consultar el cálculo del porcentaje de absorción. En los puntos 44-49 se describe la investigación de las excretas. Cuando el estudio del balance de masas no permita establecer la magnitud exacta de la absorción que sigue a la administración oral (por ejemplo, cuando se detecte en las heces más del 20 % de la dosis administrada), pueden ser necesarias otras investigaciones. Estas pueden ser de dos tipos: 1) administración oral de la sustancia problema y medición de su contenido en la bilis, o 2) administración oral o i.v. de la sustancia problema y medición, por cada una de las dos vías, de su contenido neto en orina + aire espirado + cuerpo. En los dos tipos de diseño, la medida de la radiactividad se efectúa como un método subsidiario del análisis químico específico de la sustancia problema y sus metabolitos.

33. En los estudios de excreción biliar la vía de administración tradicional es la oral. En este tipo de estudios, se canulan los conductos biliares de al menos 4 animales del sexo seleccionado (o de ambos sexos, siempre que se justifique) y se les administra una dosis única de la sustancia problema. Después de la administración se supervisa la excreción de la radiactividad/sustancia problema en la bilis durante el tiempo necesario para calcular el porcentaje de la dosis administrada que se excreta por esta vía, el cual se aplica directamente al cálculo de la absorción oral según la fórmula siguiente:

$$\text{Porcentaje de absorción} = \frac{(\text{cantidad presente en bilis} + \text{orina} + \text{aire espirado} + \text{cuerpo salvo el contenido del aparato digestivo})}{\text{cantidad administrada}} \times 100$$

34. Con determinadas sustancias se produce la secreción directa por la mucosa intestinal de la dosis absorbida. En tales casos, la medición del porcentaje de dosis en heces después de la administración oral en ratas sometidas a canulación del conducto biliar no se considera representativa de la dosis no absorbida. Se recomienda que, cuando sea previsible la secreción intestinal, el cálculo del porcentaje de dosis absorbida se base en una comparación de la dosis excretada después de las administraciones oral e i.v. (ratas con el conducto biliar intacto o canulado; véase el punto 35). Se recomienda también que, cuando se juzgue necesario cuantificar la secreción intestinal, se mida la excreción que sigue a la administración de una dosis i.v. en ratas con el conducto biliar canulado.

▼M4

*Biodisponibilidad*

35. La biodisponibilidad se puede determinar por la cinética plasmática/sanguínea medida en los grupos de administración oral e i.v., según se describe en los puntos 50-52, mediante análisis químico específico de la sustancia problema y de sus metabolitos principales, de modo que no se requiere el marcado radiactivo. El cálculo de la biodisponibilidad (F) de la sustancia problema o de sus metabolitos principales se puede hacer según la fórmula siguiente:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dosis_{IV}/Dosis_{exp})$$

donde AUC es el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo, y exp es la vía de administración experimental (oral, cutánea o inhalatoria).

36. En la evaluación del riesgo de efectos sistémicos, en general se prefiere calcular la biodisponibilidad del componente tóxico antes que el porcentaje de absorción cuando se comparan las concentraciones sistémicas observadas en animales experimentales con los datos análogos de biovigilancia obtenidos en estudios de exposición ocupacional. La situación puede hacerse más compleja si las dosis se sitúan en el intervalo de no linealidad, por lo que conviene que el cribado toxicocinético determine las dosis del intervalo lineal.

*Distribución en los tejidos*

37. El conocimiento de la distribución en los tejidos de una sustancia y de sus metabolitos es importante para la identificación de los tejidos diana, la comprensión de los mecanismos que subyacen a la toxicidad, y la calibración del potencial de acumulación y persistencia que tienen la sustancia y sus metabolitos. El porcentaje de la dosis (radiactiva) total presente en los tejidos y en el resto del cuerpo se medirá como mínimo al concluir el ensayo de excreción (habitualmente, hasta 7 días después de administrar la dosis, o menos dependiendo del comportamiento de la sustancia concreta). Cuando no se detecte la sustancia problema en los tejidos al concluir el estudio (por ejemplo, porque tenga una semivida corta y se haya eliminado antes), conviene ser precavido para no malinterpretar los datos. En estas situaciones, se investigará la distribución en los tejidos en un momento que coincida con el pico de concentración plasmática/sanguínea ($T_{máx}$) de la sustancia (y/o de sus metabolitos) o con la tasa máxima de excreción urinaria, según convenga (véase el punto 38). Puede ser necesario, además, tomar muestras de tejido en otros momentos para determinar la distribución de la sustancia problema y/o sus metabolitos, para evaluar (cuando proceda) la dependencia del tiempo, para ayudar a establecer el balance de masas o porque así lo estipule la autoridad competente. Se tomarán muestras de los tejidos siguientes: adiposo, hígado, aparato digestivo, riñón, bazo, sangre completa, resto del cuerpo, órganos diana y otros tejidos (tiroides, eritrocitos, órganos reproductores, piel y ojos, especialmente en animales pigmentados) que puedan revestir importancia para la evaluación toxicológica de la sustancia problema. Se contemplará el análisis de otros tejidos en los mismos tiempos de medición con el fin de maximizar el uso de los animales, pero también en el caso de que se observe toxicidad en un órgano diana en los estudios de toxicidad crónica o subcrónica. Se documentará además la concentración (radiactiva) residual y la relación de concentraciones en tejidos/plasma (sangre).

38. Puede ser también necesario, o requerido por la autoridad competente, el estudio de la distribución en los tejidos en un momento que coincida con el pico de concentración plasmática/sanguínea ($T_{máx}$) o con la tasa máxima de excreción urinaria, determinada en los correspondientes ensayos de cinética plasmática/sanguínea o de excreción. Tal información puede ser útil para esclarecer la toxicidad y el potencial de acumulación y persistencia de la sustancia problema y sus metabolitos. Se justificará la selección de las muestras de tejido; en general, las muestras para análisis deben ser idénticas a las ya mencionadas (véase el punto 37).

▼**M4**

39. En los estudios de distribución en los tejidos, la cuantificación de la radiactividad se puede hacer mediante disección de órganos, homogeneización, combustión y/o solubilización, seguidas de recuento de centelleo líquido (LSC) de los residuos retenidos. Algunas técnicas que se encuentran en distintas fases de desarrollo, como la autorradiografía cuantitativa del cuerpo entero y la autorradiografía microscópica de receptores, pueden ser útiles para medir la distribución de una sustancia problema en los órganos y los tejidos (3) (4).

40. Cuando la vía de exposición es distinta de la oral, se deben tomar y analizar muestras de tejidos específicos, como son los pulmones en los estudios de inhalación y la piel en los estudios dermatológicos. Véanse los puntos 74 a 78.

*Metabolismo*

41. Se tomarán muestras de excretas (y de plasma, según proceda) para la identificación y la cuantificación de la sustancia problema intacta y de sus metabolitos, tal como se describe en los puntos 44-49. Se acepta la agrupación de las excretas para facilitar la identificación metabólica en un grupo posológico dado. Se recomienda hacer un perfil de los metabolitos a intervalos de tiempo determinados. Si la carencia de muestras o de radiactividad lo impide, se admite la agrupación de la orina y las heces recogidas en distintos momentos, pero nunca es aceptable la agrupación entre distintos sexos o grupos de dosis. Se emplearán los oportunos métodos cualitativos y cuantitativos para valorar la radiactividad en orina, en heces y espirada, y si procede en la bilis de los animales tratados.

42. Se procurará por todos los medios identificar todos los metabolitos con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada y proporcionar un esquema metabólico de la sustancia problema. Deberán identificarse las sustancias problema que se hayan detectado en las excretas con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada. Por identificación se entiende la determinación estructural exacta de sus componentes. Habitualmente, la identificación se acomete mediante co-cromatografía del metabolito y de sustancias patrón conocidas aplicando dos sistemas no afines, o mediante técnicas que permiten una identificación estructural positiva como son la espectrometría de masas, la resonancia magnética nuclear (RMN), etc. En el caso de la co-cromatografía, las técnicas cromatográficas que emplean la misma fase estacionaria con dos sistemas de solvente distintos no se consideran un método adecuado de doble verificación de la identidad del metabolito, puesto que no son independientes. La identificación mediante co-cromatografía debe hacerse con dos sistemas no afines, analíticamente independientes, como son la cromatografía en capa fina (TLC) de fase normal e inversa y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La confirmación por medios espectroscópicos no será necesaria, siempre que la separación cromatográfica sea de calidad aceptable. Se puede llegar también a una identificación inequívoca con métodos que proporcionan información estructural, tales como: cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (LC-MS) o cromatografía de líquidos con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-MS) y espectroscopia de RMN.

43. Cuando no sea posible la identificación de los metabolitos con un contenido igual o superior al 5 % de la dosis administrada, se agregará una justificación o explicación en el informe final. Para llegar a una comprensión mejor de la vía metabólica que permita evaluar el riesgo o factor de riesgo que supone la sustancia problema, puede ser conveniente identificar los metabolitos con un contenido inferior al 5 % de la dosis administrada. Siempre que sea posible se aportará la confirmación estructural. Puede incluirse el perfil en plasma, sangre u otros tejidos.

▼M4

*Excreción*

44. La tasa y la velocidad de excreción de la dosis administrada se determinará midiendo el porcentaje recuperado de la dosis (radiactiva) en orina, heces y aire espirado. Estos datos ayudarán, entre otras cosas, a establecer el balance de masas. A intervalos adecuados se determinarán las cantidades de sustancia problema (radiactividad) eliminada en orina, heces y aire espirado (véanse los puntos 47-49). Los ensayos de administración continuada deben diseñarse correctamente con el fin de recopilar datos de excreción que cumplan los objetivos descritos en el punto 26. Así será posible la comparación con los ensayos de dosis única.

45. Si un estudio piloto ha demostrado (de conformidad con el punto 49) que no se excreta en el aire espirado una cantidad importante de la sustancia problema (radiactividad), no será necesario tomar muestras de aire espirado en el estudio definitivo.

46. Cada animal se ubicará en una unidad metabólica aparte para la recogida de las excretas (orina, heces y aire espirado). Al concluir cada período de recogida (véanse los puntos 47-49), las unidades metabólicas se lavan con el disolvente adecuado (lo que se llama "lavado de la jaula") para garantizar la máxima recuperación de la sustancia problema (radiactividad). La recogida de las excretas concluirá al cabo de 7 días o cuando se haya recuperado al menos el 90 % de la dosis administrada, lo que ocurra antes.

47. La cantidad total de sustancia problema (radiactividad) en la orina se determinará como mínimo en dos momentos del día 1 de recogida, uno de ellos a las 24 horas de la administración, y en lo sucesivo diariamente hasta la conclusión del estudio. Se recomienda establecer más de dos momentos de muestreo en el día 1 (por ejemplo, a las 6, 12 y 24 horas). Se analizarán los resultados de los estudios piloto para obtener información sobre otros momentos, complementarios o alternativos, de recogida. Se justificarán debidamente los programas de recogida de muestras.

48. La cantidad total de sustancia problema (radiactividad) en las heces se determinará diariamente, comenzando a las 24 horas de la administración y hasta la conclusión del estudio, salvo que los estudios piloto indiquen otros momentos, complementarios o alternativos, de recogida. Se justificará debidamente cualquier otro programa de recogida de muestras.

49. En un experimento concreto se podrá interrumpir la recogida del $CO_2$ y de otras sustancias volátiles en el aire espirado cuando en el mismo se detecte menos del 1 % de la dosis administrada durante un período de recogida de 24 horas.

**Estudios cinéticos**

*Cinética plasmática/sanguínea*

50. La finalidad de estos estudios es hacer estimaciones de los principales parámetros toxicocinéticos [$C_{máx}$, $T_{máx}$, semivida ($t_{1/2}$), AUC] de la sustancia problema. Estos estudios se pueden realizar con una sola dosis o, más frecuentemente, con dos o más dosis. La posología dependerá de la naturaleza y del objeto de la investigación. Los datos cinéticos son a veces necesarios para resolver cuestiones como la biodisponibilidad de la sustancia problema o evaluar el efecto de la dosis sobre el aclaramiento (por ejemplo, evaluar si el aclaramiento se satura de manera dependiente de la dosis).

51. En este tipo de estudios deben emplearse como mínimo 4 animales de un mismo sexo por cada grupo de dosis. Se justificará la elección del sexo de los animales empleados. Se planteará usar animales de ambos sexos (4 machos y 4 hembras) si hay indicios para sospechar variaciones importantes de la toxicidad en función del sexo.

▼M4

52. Tras la administración de la sustancia problema (radiomarcada), se tomarán muestras de sangre de cada animal en los momentos indicados y con una metodología de muestreo apropiada. El volumen y el número de las muestras de sangre que se pueden tomar de cada animal pueden estar limitados por los posibles efectos del muestreo reiterado sobre la salud y fisiología de los animales o sobre la sensibilidad del método analítico. Se analizarán las muestras de cada animal por separado. En algunas circunstancias (por ejemplo, caracterización de los metabolitos), puede estar indicado agrupar las muestras de varios animales. Las muestras agrupadas se identificarán claramente y se justificará el motivo de agruparlas. Cuando se usan sustancias químicas radiomarcadas, puede estar indicado el análisis de la radiactividad total presente. En tal caso se analizará la radiactividad total en la sangre completa y en el plasma, o bien en el plasma y los eritrocitos, para poder calcular el cociente de distribución sangre/plasma. En otras situaciones se precisan estudios más específicos, que exigen la identificación del compuesto parental y/o de sus metabolitos o del grado de afinidad por las proteínas.

*Cinética en otros tejidos*

53. La finalidad de estos estudios es conocer cómo evolucionan con el tiempo las concentraciones de la sustancia problema en los diversos tejidos, para dar respuesta a interrogantes como el mecanismo de la acción tóxica, la bioacumulación y la biopersistencia. La selección de los tejidos y de la frecuencia de medición dependerá del aspecto concreto que se pretenda investigar y de la base de datos toxicológicos de la sustancia estudiada. Para el diseño de estos estudios cinéticos complementarios se tendrá en cuenta la información acumulada, tal como se describe en los puntos 37-40. En estos estudios la administración puede ser única o continuada. Se justificará detalladamente el método elegido.

54. Los motivos para efectuar estudios cinéticos en otros tejidos pueden ser los siguientes:

— que haya indicios de una semivida prolongada en sangre, con posible acumulación de la sustancia problema en varios tejidos, o

— que interese comprobar si se ha alcanzado un estado estacionario en tejidos concretos (por ejemplo, en los estudios de administración continuada, aunque se haya alcanzado un estado estacionario aparente en sangre, puede ser interesante determinar si se ha alcanzado ese mismo estado estacionario en los tejidos diana).

55. En este tipo de investigación cinética, se administra una dosis oral apropiada de la sustancia problema como mínimo a 4 animales por cada dosis y tiempo de medición, y se supervisa la distribución en los tejidos seleccionados a lo largo del tiempo. Se puede usar un solo sexo de animales, salvo que haya indicios de toxicidad asociada al sexo. Se analizará la radiactividad total o bien el compuesto parental y/o sus metabolitos, dependiendo del aspecto que se pretenda investigar. La distribución en los tejidos se evaluará con las técnicas apropiadas.

*Inducción e inhibición enzimáticas*

56. El estudio de los posibles efectos de inducción o inhibición enzimáticas o de la biotransformación de la sustancia problema puede ser necesario en alguna de las siguientes situaciones:

1) hay indicios de una relación entre la biotransformación de la sustancia problema y el aumento de la toxicidad;

2) los datos de toxicidad disponibles indican una relación no lineal entre la dosis y el metabolismo;

▼M4

3) los resultados de los estudios de identificación de metabolitos apuntan a la formación de un metabolito potencialmente tóxico por una vía metabólica inducida por la sustancia problema;

4) para hallar explicación a efectos hipotéticamente vinculados a fenómenos de inducción enzimática;

5) si se observan alteraciones toxicológicamente significativas en el perfil metabólico de la sustancia problema, ya sea en ensayos *in vitro* o *in vivo* realizados con diferentes especies o condiciones experimentales, puede estar indicada la caracterización de las enzimas que intervienen (por ejemplo, enzimas de fase I como las isoenzimas del sistema de la monooxigenasa dependiente del citocromo P450, enzimas de fase II como el sistema enzimático de la sulfotransferasa o de la uridina-difosfato-glucuronosiltransferasa, u otras). Tal información podría ser de ayuda para evaluar la pertinencia de las extrapolaciones entre especies.

57. Deben emplearse protocolos experimentales adecuados para evaluar las alteraciones toxicocinéticas relacionadas con la sustancia problema, debidamente validados y justificados. Ejemplos de tales protocolos serían la administración continuada de una sustancia problema sin marcar, seguida de una dosis radiomarcada el día 14, o la administración continuada de una sustancia radiomarcada con muestreos los días 1, 7 y 14 para determinar los perfiles metabólicos. La administración continuada de una sustancia radiomarcada también puede aportar datos sobre su bioacumulación (véase el punto 26).

OTROS PLANTEAMIENTOS

58. Otros planteamientos complementarios de los estudios *in vivo* que se describen en el presente método de ensayo pueden proporcionar informaciones útiles sobre la absorción, distribución, metabolismo o eliminación de una sustancia problema en ciertas especies.

**Uso de la información *in vitro***

59. Algunos aspectos del metabolismo de la sustancia problema se pueden investigar en ensayos *in vitro* con la metodología adecuada. Para el estudio de los posibles metabolitos se pueden emplear aislados o cultivos recientes de hepatocitos y fracciones subcelulares (por ejemplo, microsomas y citosol o fracción S9) de hígado. El metabolismo local del órgano diana, como el pulmón, puede ser de interés para la evaluación del riesgo. A este efecto resultan útiles las fracciones microsomales de los tejidos diana. Las investigaciones con microsomas pueden ayudar a entender las posibles diferencias en función del sexo y de la edad y a caracterizar los parámetros enzimáticos ($K_m$ y $V_{máx}$) de interés para evaluar la dependencia del metabolismo en función de la dosis o los niveles de exposición. Además, las investigaciones con microsomas pueden ayudar a identificar las enzimas microsomales específicas que intervienen en el metabolismo de la sustancia problema, lo que tendría relevancia de cara a la extrapolación entre especies (véase también el punto 56). La capacidad de inducir biotransformación se puede investigar también en fracciones subcelulares de hígado (por ejemplo, microsomas y citosol) de animales previamente tratados con la sustancia de interés, *in vitro* en estudios de inducción de hepatocitos o a partir de líneas celulares específicas que expresen las enzimas relevantes. En circunstancias especiales y en las condiciones adecuadas, se podría contemplar el uso de fracciones subcelulares de tejidos humanos para investigar las posibles diferencias de biotransformación entre distintas especies. Los resultados de las investigaciones *in vitro* pueden ser útiles para el desarrollo de modelos toxicocinéticos basados en la fisiología (PBTK) (5).

▼M4

60. Los estudios de absorción dérmica *in vitro* pueden proporcionar una información suplementaria para caracterizar la absorción (6).

61. Es posible usar cultivos celulares primarios de hepatocitos y extensiones de tejido fresco para hacer investigaciones similares a las realizadas con microsomas hepáticos. En ciertos casos es posible resolver cuestiones concretas empleando líneas celulares con una expresión definida de la enzima relevante o producidas mediante ingeniería genética. En otros casos resultará útil el estudio *in vitro* de la inhibición y la inducción de las isoenzimas del citocromo P450 (CYP1A1, 2E1, 1A2, y otras) y/o de las enzimas de fase II provocada por el compuesto parental. La información obtenida puede ser aplicable a otros compuestos estructuralmente afines.

**Uso de los datos toxicocinéticos de los estudios de toxicidad como información complementaria**

62. El análisis de las muestras de sangre, tejidos o excretas obtenidas en el transcurso de cualesquiera otros estudios de toxicidad pueden proporcionar datos sobre la biodisponibilidad, la variación de las concentraciones plasmáticas con el tiempo (AUC, $C_{máx}$), la capacidad de bioacumulación, la velocidad de eliminación y los cambios metabólicos y cinéticos dependientes de la edad y del sexo.

63. Se puede enfocar el diseño del estudio para intentar dar respuesta a cuestiones relacionadas con los niveles de dosis más elevadas, como son: la saturación de las vías de absorción, biotransformación o excreción; la intervención de nuevas vías metabólicas, y la limitación de los metabolitos tóxicos.

64. La evaluación de los factores de riesgo puede hacerse extensiva a cuestiones como:

— el cambio de la sensibilidad con la edad, debido a variaciones en el estado de la barrera hematoencefálica, la función renal o la capacidad destoxificadora del hígado,

— el cambio de la sensibilidad con las subpoblaciones, debido a diferencias en la capacidad de biotransformación o a otras variaciones toxicocinéticas,

— el grado de exposición del feto, por el paso de las sustancias a través de la placenta, o del recién nacido por transmisión con la leche materna.

**Aplicación de los modelos toxicocinéticos**

65. Los modelos toxicocinéticos son aplicables a diversos aspectos de la evaluación del riesgo y de los factores de riesgo, como cuando se trata de prever la exposición sistémica y la concentración alcanzada en los tejidos internos. Permiten valorar también aspectos concretos del modo de acción y constituyen una base para la extrapolación entre especies y el esclarecimiento de las vías de exposición, las pautas de administración y la evaluación del riesgo humano. En el desarrollo de modelos PBTK para una sustancia problema y una especie determinadas son de ayuda los siguientes datos: 1) coeficientes de reparto; 2) constantes bioquímicas y parámetros fisiológicos; 3) parámetros específicos de la vía de absorción, y 4) datos cinéticos *in vivo* para la evaluación del modelo [por ejemplo, valores de aclaramiento en las vías de excreción principales (> 10 %), $K_m$ y $V_{máx}$ para valorar el metabolismo]. Los datos experimentales que se tomen para el desarrollo del modelo han de basarse en métodos científicamente reconocidos, y los resultados del modelo deben ser validados. A menudo se determinan los parámetros específicos de la sustancia problema y de la especie, como la velocidad de absorción, el coeficiente de reparto entre sangre y tejidos y las constantes metabólicas, para facilitar el desarrollo de modelos no compartimentales o basados en la fisiología (7).

▼**M4**

DATOS E INFORME

66. Es recomendable que el informe del estudio vaya acompañado de un índice.

**Cuerpo principal del informe**

67. El cuerpo principal del informe debe contener la información que se recoge en este método de ensayo, organizada en secciones y puntos de la manera siguiente:

*Resumen*

68. Esta sección del informe debe contener un resumen del diseño del estudio y una descripción de los métodos empleados. Debe destacar así mismo los principales resultados referentes al balance de masas, la naturaleza y magnitud de los metabolitos, los residuos en tejidos, la velocidad de eliminación, la capacidad de bioacumulación, las diferencias en función del sexo, etc. El resumen se presentará con el detalle suficiente para permitir la evaluación de los resultados.

*Introducción*

69. Esta sección del informe debe contener los objetivos del estudio, su justificación y diseño, así como cualquier información histórica o de referencia pertinente.

*Material y métodos*

70. En esta sección se hará una descripción pormenorizada de toda la información pertinente.

a) Sustancia problema

Esta subsección debe facilitar la identificación de la sustancia problema: denominación química, estructura molecular, determinación cualitativa y cuantitativa de la composición química, pureza y, siempre que sea posible, tipo de impurezas y sus cantidades. Debe contener además información sobre propiedades fisicoquímicas tales como el estado físico, color, solubilidad macroscópica o coeficiente de partición, estabilidad y, en su caso, corrosividad. Cuando proceda, se facilitará información acerca de los isómeros. Si se trata de una sustancia radiomarcada, esta subsección debe contener además los siguientes datos: tipo de radionucleido, posición del marcador, actividad específica y pureza radioquímica.

Se indicará el tipo o la descripción de cualesquiera vehículo, diluyentes, agentes de suspensión, emulsionantes y demás productos empleados para la administración de la sustancia problema.

b) Animales de ensayo

Esta subsección debe contener la información referente a los animales de ensayo, como la selección y justificación de la especie, cepa y edad al principio del estudio, el sexo y el peso corporal, el estado de salud y la zootecnia.

c) Métodos

Esta subsección debe contener los pormenores del diseño del estudio y la metodología empleada. Debe incluir una descripción de:

1) la justificación de cualquier cambio de la vía o de las condiciones de exposición, cuando proceda;

▼**M4**

2) la justificación para seleccionar los niveles o concentraciones de las dosis;

3) una descripción de los estudios piloto utilizados en el diseño experimental de los estudios de seguimiento, cuando proceda; se presentarán los datos que respalden el estudio piloto;

4) se describirá la forma de preparar la disolución de la dosis y, en su caso, el tipo de disolvente o vehículo;

5) el número de lotes o grupos de tratamiento y el número de animales por grupo;

6) las concentraciones y el volumen de las dosis (y la actividad específica de la dosis cuando sea radiactiva);

7) la(s) vía(s) y los métodos de administración;

8) la frecuencia de administración;

9) el período de ayuno (en su caso);

10) la radiactividad total por animal;

11) la manipulación de los animales;

12) la recogida y el tratamiento de las muestras;

13) los métodos analíticos aplicados a la separación, cuantificación e identificación de los metabolitos;

14) el límite de detección de los métodos empleados;

15) otros procedimientos y medidas experimentales empleados (entre ellos, la validación de los métodos de análisis de los metabolitos).

d) Análisis estadístico

Si se hace un análisis estadístico de los resultados, el informe debe recoger información suficiente sobre el método y el programa informático empleados, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda reevaluar y reconstruir el análisis.

En el caso de estudios de modelización de sistemas como el PBTK, la presentación de los modelos debe comprender una descripción de los mismos que permita su reconstrucción y validación independientes (véanse el punto 65 y la definiciones del apéndice):

*Resultados*

71. En esta sección se deben presentar todos los datos de manera descriptiva en el texto, así como resumidos y tabulados con la pertinente evaluación estadística. Los datos de recuento radiactivo deben resumirse y expresarse de forma adecuada a la naturaleza del estudio, habitualmente en microgramos o miligramos equivalentes por masa de muestra, aunque pueden usarse otras unidades. Esta sección debe contener ilustraciones gráficas de los resultados, una reproducción de los datos cromatográficos y espectrométricos representativos, la identificación y cuantificación de los metabolitos y las rutas metabólicas propuestas, acompañadas de la estructura molecular de los metabolitos. Debe contener además, cuando proceda, la siguiente información:

1) Recuperación absoluta y relativa de la radiactividad en orina, heces, aire espirado y líquidos de lavado (de orina y heces) de la jaula.

— En los estudios dermatológicos, se incluirán también los datos de recuperación de la sustancia problema en la piel tratada y los lavados epidérmicos; y radiactividad residual en el dispositivo de cobertura de la piel y en la unidad metabólica, así como en los líquidos analizados del lavado epidérmico. Se ofrecen más observaciones en los puntos 74 a 77.

▼M4

— En los estudios de inhalación se incluirán también los datos de recuperación de la sustancia problema en los pulmones y tejidos nasales (8). Se ofrecen más observaciones en el punto 78.

2) Distribución en los tejidos, expresada en porcentaje de la dosis administrada y en concentración (microgramos equivalentes por gramo de tejido), y coeficiente de reparto tejidos-sangre o tejidos-plasma.

3) Se calculará el balance de masas en todos los estudios en que se valoren los tejidos corporales y las excretas.

4) Concentraciones plasmáticas y parámetros toxicocinéticos (biodisponibilidad, AUC, $C_{máx}$, $T_{máx}$, eliminación, semivida) medidos después de la administración por la vía o vías de exposición principales.

5) Velocidad y porcentaje de absorción de la sustancia problema después de su administración por la vía o vías de exposición principales.

6) Cantidades de la sustancia problema y de sus metabolitos (expresadas en porcentaje de la dosis administrada) que se recuperan en las excretas.

7) Referencias a los datos del apéndice que reflejan los resultados individuales de cada animal en todos los parámetros (dosis administrada, porcentaje de recuperación, concentraciones, parámetros toxicocinéticos, etc.).

8) representación gráfica de las rutas metabólicas propuestas y las estructuras moleculares de los metabolitos.

*Discusión y conclusiones*

72. En esta sección el autor o autores deben:

1) proponer una ruta metabólica hipotética basada en los resultados de metabolismo y eliminación de la sustancia problema;

2) comentar cualquier posible diferencia de eliminación y/o biotransformación de la sustancia problema en función de la especie y del sexo;

3) tabular y comentar la identificación y la cuantificación de los metabolitos, velocidades de eliminación, capacidad de bioacumulación y nivel residual en los tejidos del compuesto parental o de sus metabolitos y, en su caso, las posibles variaciones toxicocinéticas dependientes de la dosis;

4) incorporar a esta sección cualesquiera datos toxicocinéticos de interés que se hayan obtenido en el transcurso de los estudios de toxicidad;

5) presentar una conclusión concisa que esté respaldada por los resultados del estudio;

6) añadir las secciones que se juzguen necesarias o pertinentes.

73. Se pueden añadir secciones para adjuntar referencias bibliográficas, tablas, figuras, apéndices, etc.

▼M4

VÍAS DE EXPOSICIÓN ALTERNATIVAS

**Cutánea**

*Tratamiento cutáneo*

74. En esta sección se recoge información específicamente relacionada con la investigación toxicocinética de la sustancia problema por vía cutánea. La absorción cutánea se describe en el capítulo B.44 de este anexo [Absorción cutánea: método *in vivo* (9)]. Para otros parámetros como los relacionados con la distribución y el metabolismo puede aplicarse este método de ensayo B.36. En el tratamiento cutáneo se aplican una o más concentraciones de la sustancia problema. La sustancia problema (material puro, diluido o formulado que contiene la sustancia problema y que se aplica a la piel) debe ser la misma (o un análogo realista) que aquella a la que pudiera verse expuesto el hombre u otra posible especie diana. Las dosis deben seleccionarse de conformidad con los puntos 20-26 de este método de ensayo. En la selección de la dosis cutánea se tendrán en cuenta factores como la exposición humana previsible y las concentraciones a las que se haya observado toxicidad en otros estudios de toxicidad cutánea. La dosis cutánea se disolverá, si es preciso, en un vehículo adecuado y se aplicará en el volumen necesario para liberar la dosis prevista. Antes de proceder a la aplicación, se recorta el pelo de la región dorsal del tronco de los animales. Se puede recurrir al rasurado, pero, en este caso, debe efectuarse unas 24 horas antes del ensayo. En ambos casos hay que cuidar de no lesionar la piel, lo que podría alterar su permeabilidad. Deberá dejarse despejada, para la aplicación de la sustancia problema, una superficie equivalente aproximadamente al 10 % de la corporal. Cuando se trata de sustancias muy tóxicas, la superficie despejada puede ser inferior al 10 %, pero deberá cubrirse en todo lo posible con una capa delgada y uniforme del producto. En todos los grupos de tratamiento cutáneo se tratará una superficie de piel de la misma extensión. Las zonas tratadas se protegerán con un apósito bien sujeto. Los animales se enjaularán por separado.

75. Debe hacerse un estudio de lavado epidérmico para evaluar la fracción de la dosis de sustancia química aplicada que se puede eliminar de la piel lavando la zona tratada con agua y un jabón suave. Este estudio puede servir también para establecer el balance de masas cuando la sustancia problema se administra por vía cutánea. En el estudio de lavado epidérmico se aplica una dosis única de la sustancia problema a dos animales. La selección de la dosis se hará de conformidad con el punto 23 de este método de ensayo (véase también el tiempo de contacto epidérmico en el punto 76). Se determinan las cantidades de la sustancia problema que se recuperan en los líquidos de lavado, a fin de evaluar la eficacia con que dicho lavado elimina la sustancia de la piel.

76. Salvo que sea corrosiva, la sustancia problema se aplica y mantiene sobre la piel durante un tiempo mínimo de 6 horas. En el momento de retirar el apósito, la zona tratada se lava siguiendo el procedimiento descrito en el estudio de lavado epidérmico (véase el punto 75). Se analizará el contenido de sustancia residual en el apósito y en los líquidos de lavado. Al concluir la investigación, se sacrificará cada animal de manera compasiva, de conformidad con (2), y se le retirará la piel tratada. Se prepara debidamente un corte de piel tratada para analizarlo y valorar la sustancia (radiactividad) residual.

77. En la evaluación toxicocinética de los productos farmacéuticos puede ser necesario aplicar diversos procedimientos, de conformidad con el marco regulador apropiado.

▼**M4**

**Inhalación**

78. Se emplea una concentración única (o más, si es necesario) de la sustancia problema. Las concentraciones deben seleccionarse de conformidad con los puntos 20-26 de este método de ensayo. Los tratamientos de inhalación deben hacerse con un equipo inhalador de "cono nasal" o de "solo la cabeza" para evitar la absorción por otras vías (8). Si las condiciones de exposición son otras, habrá que justificar y documentar los cambios. Se definirá el tiempo de inhalación; es habitual una exposición de 4-6 horas.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.

(2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N$^{o}$ 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.

(3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73-81.

(4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25-40.

(5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

(6) Capítulo B.45 del presente anexo. Absorción cutánea: método *in vitro*.

(7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.

(9) Capítulo B.44 del presente anexo. Absorción cutánea: método *in vivo*.

(10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9-35.

(11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), Pharmacokinetics, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

*Apéndice*

DEFINICIONES

**Absorción:** conjunto de procesos por los que una sustancia pasa a los tejidos orgánicos. El término se refiere a la absorción del compuesto parental y de todos sus metabolitos. No debe confundirse con la "biodisponibilidad".

**Absorción oral:** porcentaje de la dosis de sustancia que es absorbido en el lugar de administración (es decir, el aparato digestivo). Este importante parámetro sirve para conocer la fracción de la sustancia química administrada que llega a la vena porta y, posteriormente, al hígado.

**Acumulación:** (bioacumulación)aumento del contenido de una sustancia en los tejidos a lo largo del tiempo (generalmente en el tejido adiposo y por administración continuada); si la velocidad a la que penetra una sustancia en el organismo es superior a la velocidad con que se elimina, la sustancia se acumula en el organismo y puede alcanzar concentraciones tóxicas.

**ADME:** siglas de "Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción".

**AUC:** (área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo): área bajo la curva que resulta de representar la concentración plasmática de una sustancia problema en función del tiempo. Representa la cantidad total de la sustancia problema que ha absorbido el organismo en un período establecido. En condiciones de linealidad, el AUC (desde el tiempo cero al infinito) es proporcional a la cantidad total de la sustancia problema que absorbe el organismo, independientemente de cuál sea la velocidad de absorción.

**Autorradiografía:** (autorradiografía de cuerpo entero): empleada para determinar cualitativa o cuantitativamente la localización de una sustancia química radiactiva en los tejidos, esta técnica se vale de las imágenes de rayos X o, más recientemente, de la fluoroscopia digital para visualizar moléculas (o fragmentos de moléculas) marcadas radiactivamente registrando la radiación emitida en la víscera o tejido que se desea estudiar. Comparada con la disección de órganos, la autorradiografía cuantitativa de cuerpo entero puede aportar ciertas ventajas para valorar la distribución de la sustancia problema, la recuperación total y la resolución del material radiactivo en los tejidos. Otra ventaja importante es que se puede aplicar a un modelo animal pigmentado para valorar la posible asociación de la sustancia problema con la melanina, capaz de unirse a ciertas moléculas. No obstante, y aunque puede facilitar una interesante visión global de los sitios de unión de alta capacidad y baja afinidad, esta técnica tendría limitaciones para reconocer regiones diana específicas, como los sitios de unión a receptores, para cuya detección se precisa una resolución relativamente alta y una elevada sensibilidad. Cuando se usa la autorradiografía deben realizarse, en un grupo aparte o en un estudio separado del ensayo de distribución en los tejidos, investigaciones para determinar el balance de masas del compuesto administrado, en las que todas las excretas (con la posible inclusión del aire espirado) y los restos del cuerpo de los animales sean homogeneizados y analizados con contador de centelleo líquido.

**Autorradiografía microscópica de receptores:** (o microautorradiografía): técnica que puede servir para comprobar la interacción de una sustancia xenobiótica con poblaciones celulares o sitios específicos de los tejidos, como en el caso de las investigaciones de la unión a los receptores o de los mecanismos de acción específicos, donde se precisan una resolución y una sensibilidad elevadas que no se consiguen con otras técnicas como la autorradiografía de cuerpo entero.

**Balance de masas:** expresa la cantidad de sustancia que entra y sale del sistema.

**Balance de materia:** véase "balance de masas".

▼M4

**Bioacumulación:** véase "Acumulación".

**Biodisponibilidad:** fracción de la dosis administrada que pasa a la circulación sistémica o está disponible en los tejidos para ejercer su actividad fisiológica. Frecuentemente, la biodisponibilidad de una sustancia se refiere al compuesto parental, pero también puede referirse a su metabolito. Tiene en cuenta solamente una forma química. *Nota bene:* no confundir biodisponibilidad con absorción. Así, la diferencia entre la absorción oral (contenido de la sustancia en la mucosa intestinal y en la circulación portal) y la biodisponibilidad (contenido en la sangre circulante y en los tejidos) puede deberse, entre otros factores, a: 1) la degradación química efectuada por digestión en la mucosa intestinal, 2) la circulación enterohepática que devuelve parte de la sustancia a la luz intestinal, o 3) el metabolismo hepático de primer paso (10). La biodisponibilidad del componente tóxico (compuesto parental o metabolito) es un parámetro esencial en la evaluación del riesgo humano (extrapolación entre dosis altas y bajas, o entre distintas vías), ya que permite obtener un valor interno partiendo de los valores de NOAEL o BMD (dosis administrada), que son externos. Para evaluar los efectos hepáticos que siguen a una administración oral, basta con conocer la absorción oral. En cambio, cuando se estudian los efectos en lugares distintos de la vía de entrada, la biodisponibilidad es en general un parámetro más fiable que la absorción para evaluar el riesgo.

**Biopersistencia:** véase "persistencia".

**Biotransformación:** conversión química (generalmente enzimática) de la sustancia de interés en un producto diferente, que tiene lugar en el organismo. Es sinónimo de "metabolismo".

**$C_{máx}$:** concentración máxima (pico) en sangre (plasma o suero), o bien excreción máxima (pico) en orina y heces, que se produce después de la administración.

**Coeficiente de reparto:** también llamado coeficiente de distribución, es una medida de la solubilidad diferencial de una sustancia en dos solventes.

**Compartimento:** parte (o unidad) estructural o bioquímica de un organismo, tejido o célula que puede diferenciarse del resto.

**Concentración máxima (pico) en sangre (plasma o suero):** máxima concentración (o pico) que se alcanza en la sangre (plasma o suero) después de administrar una sustancia (véase también "$C_{máx}$").

**Concentraciones sanguíneas (plasmáticas) en estado estacionario:** estado de no equilibrio de un sistema abierto, en el que todas las fuerzas que actúan sobre él están exactamente contrarrestadas por fuerzas opuestas de manera tal que todos sus componentes se hallan en concentración estacionaria pese a que fluye materia a través del sistema.

**Correlación o "read across":** método por el cual se toman los datos conocidos de una variable en respuesta a una o varias sustancias para predecir el comportamiento de esa variable en respuesta a la sustancia problema.

**Distribución:** dispersión de una sustancia problema y de sus metabolitos por todo el organismo.

**Distribución en los tejidos:** movimiento reversible de una sustancia problema por los distintos tejidos orgánicos. La distribución en los tejidos se puede estudiar mediante disección de órganos, homogeneización, combustión y recuento de centelleo líquido, o mediante autorradiografía cualitativa y cuantitativa del cuerpo entero. El primer método resulta válido para obtener la concentración y el porcentaje de recuperación en los tejidos y en el resto del cuerpo de un mismo animal, pero puede no alcanzar resolución adecuada en todos los tejidos y puede arrojar una recuperación total inferior a de lo deseable (< 90 %). Consúltense más arriba las definiciones del segundo método.

**Enzimas/isoenzimas:** proteínas que catalizan las reacciones bioquímicas. Las isoenzimas son enzimas que catalizan reacciones bioquímicas semejantes, pero que presentan secuencias de aminoácidos diferentes.

▼M4

**Excreción biliar:** excreción que tiene lugar a través de los conductos biliares.

**Excreción:** conjunto de procesos por los que una sustancia administrada y/o sus metabolitos son eliminados del organismo.

**Exógeno:** generado o introducido desde fuera del organismo o sistema orgánico.

**Extrapolación:** método por el que se infiere uno o más valores desconocidos a partir de otros conocidos u observados.

**Inducción enzimática:** síntesis enzimática que se produce como respuesta a un estímulo ambiental o una molécula inductora.

**Linealidad/cinética lineal:** un proceso tiene una cinética lineal cuando todos los intercambios entre compartimentos se producen a una velocidad proporcional a la concentración o cantidad presente; es una cinética de primer orden. En consecuencia, los volúmenes de eliminación y distribución son constantes, al igual que la semivida. Las concentraciones alcanzadas son proporcionales al nivel de dosis (exposición) y la acumulación es más facil de predecir. La existencia o no de linealidad se puede determinar comparando los parámetros oportunos, como el AUC, después de administrar dosis diferentes o después de exposiciones únicas y repetidas. La falta de dependencia de la dosis puede indicar saturación de las enzimas que intervienen en el metabolismo del compuesto; un aumento del AUC después de la exposición continuada en comparación con la exposición única puede indicar inhibición del metabolismo; y una disminución del AUC puede indicar, a su vez, inducción del metabolismo [véase también (11)].

**Mecanismo (modo) de toxicidad/mecanismo (modo) de acción:** por mecanismo de acción se entienden las interacciones bioquímicas específicas por las que una sustancia química produce su efecto. Por modo de acción se entienden las principales rutas o vías más generales por las que una sustancia llega a producir su efecto (o toxicidad).

**Metabolismo:** es sinónimo de "biotransformación".

**Metabolitos:** productos del metabolismo o de los procesos metabólicos.

**Modelización de sistemas (toxicocinética basado en la fisiología, basada en la farmacocinética, farmacocinética basada en la fisiología, basada en la biología, etc.):** modelo abstracto que aplica el lenguaje matemático para describir el comportamiento de un sistema.

**Parámetros enzimáticos:** $K_m$ (constante de Michaelis) y $V_{máx}$ (velocidad máxima).

**Persistencia (biopersistencia):** presencia prolongada de una sustancia en un sistema biológico debido a que resiste la degradación/eliminación.

**Saturación:** estado en virtud del cual uno o varios procesos cinéticos (absorción, metabolismo o eliminación) se encuentran en su límite máximo, es decir, saturados.

**Semivida ($t_{1/2}$):** tiempo necesario para que la concentración de una sustancia se reduzca a la mitad en un compartimento dado. Normalmente se refiere a la concentración plasmática o a la cantidad de sustancia en todo el organismo.

**Sensibilidad:** capacidad de un método o instrumento para reflejar pequeñas diferencias en el grado de respuesta de una variable de interés.

**Sustancia problema:** cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

**Tejido diana:** tejido en el que se manifiesta el efecto adverso principal de un agente tóxico.

**$T_{máx}$:** tiempo que se tarda en alcanzar la $C_{máx}$.

▼M4

**Toxicocinética (farmacocinética):** estudio de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de las sustancias a lo largo del tiempo.

**Validación de los modelos:** proceso por el cual se evalúa la adecuación de un modelo para describir de manera coherente los datos toxicocinéticos disponibles. Los modelos se pueden evaluar mediante comparación visual y estadística de las predicciones del modelo con los valores experimentales obtenidos para una variable independiente común (por ejemplo, el tiempo). Se ha de justificar la magnitud de la evaluación en relación con el uso que se pretende dar al modelo.

**Velocidad (o tasa) de aclaramiento:** es una medida cuantitativa de la cantidad de una sustancia problema que se elimina de la sangre, el plasma o un determinado tejido por unidad de tiempo.

**Vía de administración (oral, i.v., cutánea, inhalatoria, etc.):** medio por el cual se administran las sustancias químicas al organismo (por ejemplo, por vía oral con los alimentos o mediante sonda gástrica, por inyección intravenosa, por vía cutánea a través de la piel, por inhalación con el aire aspirado, etc.).

**Vías de destoxificación:** conjunto de procesos que llevan a la eliminación de las sustancias tóxicas del organismo, ya sea por degradación metabólica o por excreción.

▼B

## B.37. NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS POR ADMINISTRACIÓN ÚNICA

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

En la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, es importante considerar el potencial de ciertas clases de sustancias para causar tipos específicos de neurotoxicidad que pueden no detectarse con otros estudios de toxicidad. Se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada, por lo que debe considerarse su evaluación.

Pueden emplearse ensayos de cribado *in vitro* para detectar las sustancias capaces de producir polineuropatía retardada; sin embargo, unos resultados negativos en los estudios *in vitro* no excluyen que la sustancia estudiada sea neurotóxica.

Véase la Introducción general, Parte B.

#### 1.2. DEFINICIONES

*Sustancias organofosforadas:* ésteres organofosforados sin carga, tioésteres o anhídridos de ácidos organofosfóricos, organofosfónicos u organofosforamídicos, o de ácidos fosforotioicos, fosfono-tioicos o fosforotioamídicos afines, u otras sustancias que puedan producir la neurotoxicidad retardada que a veces se aprecia en esta clase se sustancias.

*Neurotoxicidad retardada:* síndrome asociado con la aparición retardada y prolongada de ataxia, axonopatías distales en la médula espinal y en los nervios periféricos, e inhibición y envejecimiento de la esterasa diana de la neuropatía (NTE) en el tejido nervioso.

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Puede someterse a ensayo una sustancia de referencia con un lote de control positivo como medio para demostrar que, en las condiciones de ensayo del laboratorio, no cambia significativamente la respuesta de las especies utilizadas.

Como ejemplo de neurotóxico de amplia utilización está el folfato de tri-o-tolilo [nº CAS 78-30-8, nº EINECS 201-103-5, denominación CAS: tris(2-metilfenil) éster del ácido fosfórico], conocido también como tri-o-cresilfosfato.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se da una sola dosis oral de la sustancia estudiada a gallinas domésticas, protegidas de los efectos colinérgicos agudos, cuando convenga. Se observa durante 21 días la aparición en los animales de anomalías de comportamiento, ataxia y parálisis. Se realizan medidas bioquímicas, especialmente la inhibición de la esterasa diana de la neuropatía (NTE), en gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada lote, normalmente a las 24 y 48 horas de la administración. A los 21 días de la exposición, se sacrifican las gallinas restantes y se procede al examen histopatológico de tejidos nerviosos seleccionados.

▼B

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Preparación**

Se seleccionan al azar gallinas jóvenes sanas, libres de enfermedades víricas que puedan interferir y sin tratamiento médico, que no presenten anomalías de la marcha, se asignan a los lotes de tratamiento y de control y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 5 días antes del inicio del estudio.

Deben utilizarse jaulas o recintos de la capacidad suficiente para permitir la libre movilidad de las gallinas y la fácil observación de su marcha.

La sustancia estudiada se administrará normalmente por vía oral, utilizando sondas gástricas, cápsulas de gelatina o un método similar. Los líquidos pueden administrarse sin diluir o disueltos en un vehículo apropiado, como el aceite de maíz; los sólidos deben disolverse siempre que sea posible, ya que las grandes dosis de productos sólidos en cápsulas de gelatina pueden no absorberse de forma eficaz. Respecto a los vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas; en caso de no conocerse, se determinarán antes de la prueba.

1.5.2. **Condiciones del ensayo**

1.5.2.1. *Animales de experimentación*

Se recomienda la gallina ponedora doméstica adulta *(Gallus gallus domesticus),* de una edad comprendida entre 8 y 12 meses. Deben emplearse razas y variedades de tamaño normal y las gallinas se habrán criado normalmente en condiciones que permitan su movilidad libre.

1.5.2.2. *Número y sexo*

Además del lote de tratamiento, se utilizarán tanto un lote de control del vehículo como un lote de control positivo. El lote de control del vehículo debe tratarse de la misma forma que el lote de tratamiento, salvo que se omitirá la administración de la sustancia estudiada.

En cada lote de aves debe utilizarse un número suficiente de gallinas de forma que puedan matarse al menos 6 aves para hacer las determinaciones bioquímicas (3 en cada uno de los dos momentos seleccionados) y otras 6 puedan sobrevivir durante el período de 21 días de observación de las patologías.

El lote de control positivo puede estudiarse a la vez o bien ser un lote de control estudiado recientemente. Debe incluir al menos 6 gallinas, tratadas con un neurotóxico conocido de efecto retardado, de las que 3 se destinarán a las pruebas bioquímicas y otras 3 a la observación de la patología. Se recomienda la actualización periódica de los datos de los antecedentes. Deben obtenerse nuevos datos de lotes de control positivo cuando el laboratorio que realice las pruebas haya cambiado algún elemento fundamental de estas (por ejemplo, raza, alimentación, condiciones de alojamiento).

▼B

1.5.2.3. *Dosis*

Debe realizarse un estudio preliminar con un número adecuado de gallinas y lotes de distintas dosis, a fin de determinar la dosis que debe utilizarse en el estudio principal. En el estudio preliminar es necesario que se produzca letalidad, a fin de definir una dosis adecuada para el estudio principal. No obstante, para evitar la muerte debida a los efectos colinérgicos agudos, puede utilizarse atropina u otro agente protector que no interfiera con las respuestas neurotóxicas retardadas. Pueden utilizarse diversos métodos de ensayo para evaluar la dosis máxima no letal de las sustancias estudiadas (véase el método B.1 *bis*). También puede ayudar a seleccionar la dosis la consideración de datos de antecedentes de las gallinas u otra información toxicológica.

La dosis de la sustancia en el estudio principal debe ser lo más elevada posible, teniendo en cuenta los resultados del estudio preliminar de selección de la dosis y el límite superior a 2 000 mg/kg de peso corporal. La mortalidad que pueda darse no debe interferir con la supervivencia de animales suficientes para las pruebas bioquímicas (6) e histológicas (6) hasta el día 21. Debe utilizarse atropina u otro agente protector que no interfiera con las respuestas neurotóxicas retardadas, para evitar la muerte por efectos colinérgicos agudos.

1.5.2.4. *Ensayo límite*

Si un ensayo con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo los procedimientos descritos para el presente estudio, no produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de los datos procedentes de sustancias relacionadas estructuralmente, no cabe esperar la aparición de fenómenos tóxicos, puede considerarse innecesario un estudio con una dosis superior. El ensayo límite es aplicable excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

1.5.2.5. *Período de observación*

El período de observación debe ser de 21 días.

1.5.3. **Procedimiento**

Tras administrar un protector para evitar la muerte por efectos colinérgicos agudos, se administra una sola dosis de la sustancia estudiada.

1.5.3.1. Observación general

La observación debe iniciarse inmediatamente tras la administración. Todas las gallinas deben observarse cuidadosamente varías veces durante los 2 primeros días y posteriormente al menos una vez al día durante un período de 21 días o hasta el sacrificio programado. Deben registrarse todos los signos de toxicidad, con inclusión del momento de aparición, tipo, gravedad y duración de las anomalías de comportamiento. La ataxia debe medirse con una escala de clasificación ordinal consistente en un mínimo de cuatro niveles, y debe registrarse la eventual parálisis. Al menos dos veces por semana deben sacarse de las jaulas las gallinas seleccionadas para la observación de las patologías y someterse a un período de actividad motriz forzada (como subida de una escalera) a fin de facilitar la observación de efectos tóxicos mínimos. Los animales moribundos o que presenten dolor o sufrimiento intenso deben sacarse en cuanto se observen, sacrificarse de forma compasiva y someterse a autopsia.

▼B

1.5.3.2. Peso corporal

Deben pesarse todas las gallinas justo antes de la administración de la sustancia estudiada y al menos una vez por semana posteriormente.

1.5.3.3. Bioquímica

En el plazo de unos días después de la administración, deben sacrificarse 6 gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los lotes de tratamiento y de control del vehículo, y tres del lote de control positivo (cuando este lote se utilice en paralelo). El cerebro y la médula lumbar se prepararán y estudiarán para detectar la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Además, también puede ser útil preparar y estudiar tejido del nervio ciático para medir la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Normalmente, se sacrificarán 3 aves del lote de control y de cada lote de tratamiento a las 24 horas, y otras tres a las 48 horas, mientras que las tres gallinas de los controles positivos se sacrificarán a las 24 horas. Si la observación de signos clínicos de intoxicación (esta puede evaluarse frecuentemente observando el momento de aparición de signos colinérgicos) indica que el agente tóxico se elimina muy despacio, podrá ser preferible tomar dos veces tejidos de 3 aves entre las 24 y las 72 horas a partir de la administración.

También pueden hacerse análisis de la acetilcolinesterasa (ACE) con estas muestras, si se considera conveniente. No obstante, puede darse *in vivo* una reactivación espontánea de la ACE, llevando así a una subestimación de la potencia de la sustancia como inhibidora de la ACE.

1.5.3.4. Autopsia macroscópica

La autopsia macroscópica de todos los animales (sacrificados de forma programada y sacrificados por encontrarse moribundos) debe incluir la observación del aspecto del cerebro y de la médula espinal.

1.5.3.5. Examen histopatológico

Se someterán a examen microscópico muestras de tejido nervioso de los animales supervivientes al final del período de observación que no se hayan utilizado en los estudios bioquímicos. Los tejidos se fijarán *in situ,* utilizando técnicas de perfusión. Las secciones serán del cerebelo (nivel medio longitudinal), bulbo raquídeo, médula espinal y nervios periféricos. Las secciones de la médula espinal deben tomarse del segmento cervical superior y de las regiones media-dorsal y lumbo-sacra. Deben tomarse también secciones de la región distal del nervio tibial y sus ramificaciones al músculo gastrocnemio y del nervio ciático. Las secciones se someterán a tinción con colorantes adecuados específicos de la mielina y del axón.

2. **RESULTADOS**

La obtención de resultados negativos respecto a los parámetros seleccionados en este método (bioquímica, histopatología y observación del comportamiento) no requiere normalmente la realización de más ensayos de neurotoxicidad retardada. La obtención de resultados dudosos o ambiguos respecto a estos parámetros sí puede hacer necesaria otra evaluación.

Deben proporcionarse datos individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma tabular, indicando para cada lote de ensayo el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales que presenten lesiones o efectos bioquímicos o de comportamiento, los tipos y gravedad de estas alteraciones, y el porcentaje de animales que presenten cada tipo y grado de alteración.

▼B

Las observaciones del presente estudio deben evaluarse en términos de incidencia, gravedad y correlación de los efectos bioquímicos, histopatológicos y de comportamiento, así como cualquier otro efecto observado en los lotes tratados y de control.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante métodos estadísticos adecuados de aceptación general. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

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

Animales de ensayo:

— variedad utilizada,

— número y edad de los animales,

— origen, condiciones de alojamiento, etc.,

— peso de cada animal al inicio de la prueba.

Condiciones del ensayo:

— datos sobre la preparación, estabilidad y homogeneidad de la sustancia estudiada, cuando convenga,

— justificación de la elección del vehículo,

— datos sobre la administración de la sustancia estudiada,

— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua,

— justificación de la selección de la dosis,

— especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado

— identidad y datos de la administración de cualquier protector.

Resultados:

— datos sobre el peso corporal,

— datos de la respuesta tóxica por lotes, incluida la mortalidad,

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (tanto si son reversibles como si no),

— descripción detallada de los métodos y observaciones bioquímicas,

— observaciones de la autopsia,

— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de tos resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

El presente método es análogo a la TG 418 de la OCDE

▼B

B.38. **NEUROTOXICIDAD RETARDADA DE SUSTANCIAS ORGANOFOSFORADAS. ESTUDIO POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA DE 28 DÍAS**

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

En la evaluación de los efectos tóxicos de las sustancias, es importante considerar el potencial de ciertas clases de sustancias para causar tipos específicos de neurotoxicidad que pueden no detectarse con otros estudios de toxicidad. Se ha visto que ciertas sustancias organofosforadas producen neurotoxicidad retardada, por lo que debe considerarse su evaluación.

Pueden emplearse ensayos de cribado *in vitro* para detectar las sustancias capaces de producir polineuropatía retardada; sin embargo, unos resultados negativos en los estudios *in vitro* no excluyen que la sustancia estudiada sea neurotóxica.

Este ensayo de 28 días de neurotoxicidad retardada proporciona información sobre los riesgos sanitarios que puede provocar una exposición repetida a lo largo de un período limitado de tiempo. Da información sobre la respuesta a las dosis y proporciona una estimación del nivel sin efectos adversos observados que puede ser útil para establecer criterios de seguridad de la exposición.

Véase la Introducción general, Parte B.

1.2. DEFINICIONES

*Sustancias organofosforadas:* ésteres organofosforados sin carga, tioésteres o anhídridos de ácidos organofosfóricos, organofosfóricos u organofosforamídicos, o de ácidos fosforotioicos, fosfono-tioicos o fosforotioamídicos afines, u otras sustancias que puedan producir la neurotoxicidad retardada que a veces se aprecia en esta clase de sustancias.

*Neurotoxicidad retardada:* síndrome asociado con la aparición retardada y prolongada de ataxia, axonopatías distales en la médula espinal y en los nervios periféricos, e inhibición y envejecimiento de la esterasa diana de la neuropatía (NTE) en el tejido nervioso.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se dan dosis orales diarias de la sustancia estudiada a gallinas domésticas durante 28 días. Se observa al menos diariamente la aparición en los animales de anomalías de comportamiento, ataxia y parálisis, hasta que pasen 14 días desde la última administración. Se realizan medidas bioquímicas, especialmente la inhibición de la esterasa diana de la neuropatía (NTE), en gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada lote, normalmente a las 24 y 48 horas de la última administración. A las dos semanas de la última dosis, se sacrifican las gallinas restantes y se procede al examen histopatológico de tejidos nerviosos seleccionados.

▼B

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

Se seleccionan al azar gallinas jóvenes sanas, libres de enfermedades víricas que puedan interferir y sin tratamiento médico, que no presenten anomalías de la marcha, se asignan a los lotes de tratamiento y de control y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante un mínimo de 5 días antes del inicio del estudio.

Deben utilizarse jaulas o recintos de la capacidad suficiente para permitir la libre movilidad de las gallinas y la fácil observación de su marcha.

La sustancia estudiada se administrará todos y cada uno de los días por vía oral, de preferencia utilizando sondas gástrica o cápsulas de gelatina. Los líquidos pueden administrarse sin diluir o disueltos en un vehículo apropiado, como el aceite de maíz; los sólidos deben disolverse siempre que sea posible, ya que las grandes dosis de productos sólidos en cápsulas de gelatina pueden no absorberse de forma eficaz. Respecto a los vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas; en caso de no conocerse, se determinarán antes de la prueba.

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Animales de experimentación*

Se recomienda la gallina ponedora doméstica adulta *(Gallus gallus domesticus),* de una edad comprendida entre 8 y 12 meses. Deben emplearse razas y variedades de tamaño normal y las gallinas se habrán criado normalmente en condiciones que permitan su movilidad libre.

1.4.2.2. *Número y sexo*

Se utilizarán generalmente al menos tres lotes de tratamiento y un lote de control del vehículo. El lote de control del vehículo debe tratarse de la misma forma que el lote de tratamiento, salvo que se omitirá la administración de la sustancia estudiada.

En cada lote de aves debe utilizarse un número suficiente de gallinas de forma que puedan matarse al menos 6 aves para hacer las determinaciones bioquímicas (3 en cada uno de los dos momentos seleccionados) y otras 6 puedan sobrevivir durante el período de 14 días tras la exposición destinado a la observación.

1.4.2.3. *Dosis*

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta los resultados de un ensayo de neurotoxicidad aguda retardada y cualesquiera otros datos existentes sobre toxicidad o cinética del compuesto estudiado. La dosis superior debe elegirse con el fin de inducir efectos tóxicos, de preferencia neurotoxicidad retardada, pero sin producir la muerte ni sufrimiento patente. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados con la dosis inferior.

▼B

1.4.2.4. *Ensayo límite*

Si un ensayo con una dosis de al menos 1 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo los procedimientos descritos para el presente estudio, no produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de los datos procedentes de sustancias relacionadas estructuralmente, no cabe esperar la aparición de fenómenos tóxicos, puede considerarse innecesario un estudio con una dosis superior. El ensayo límite es aplicable excepto cuando la exposición humana prevista indique la necesidad de utilizar una dosis superior

1.4.2.5. *Período de observación*

Todos los animales se observarán al menos una vez al día durante el período de exposición y durante 14 días después, salvo en los casos de autopsia prevista.

1.4.3. **Procedimiento**

Los animales reciben la sustancia estudiada todos y cada uno de los días durante un período de 28 días.

1.4.3.1. *Observación general*

La observación debe iniciarse inmediatamente tras el inicio del tratamiento. Todas las gallinas deben observarse cuidadosamente al menos una vez al día durante cada uno de los 28 días del tratamiento y durante 14 días tras la última administración o hasta el sacrificio programado. Deben registrarse todos los signos de toxicidad, con inclusión del momento de aparición, tipo, gravedad y duración. Las observaciones incluirán las anomalías del comportamiento, sin limitarse a ellas. La ataxia debe medirse con una escala de clasificación ordinal consistente en un mínimo de cuatro niveles, y debe registrarse la eventual parálisis. Al menos dos veces por semana deben sacarse de las jaulas las gallinas y someterse a un período de actividad motriz forzada (como subida de una escalera) a fin de facilitar la observación de efectos tóxicos mínimos. Los animales moribundos o que presenten dolor o sufrimiento intenso deben sacarse en cuanto se observen, sacrificarse de forma compasiva y someterse a autopsia.

1.4.3.2. *Peso corporal*

Deben pesarse todas las gallinas justo antes de la primera administración de la sustancia estudiada y al menos una vez por semana posteriormente.

1.4.3.3. *Bioquímica*

En el plazo de unos días después de la última administración, deben sacrificarse 6 gallinas seleccionadas aleatoriamente de cada uno de los lotes de tratamiento y de control del vehículo. El cerebro y la médula lumbar se prepararán y estudiarán para detectar la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Además, también puede ser útil preparar y estudiar tejido del nervio ciático para medir la actividad de inhibición de la esterasa diana de la neuropatía. Normalmente, se sacrificarán 3 aves del lote de control y de cada lote de tratamiento a las 24 horas, y otras 3 a las 48 horas de la última administración. Si de datos procedentes del estudio de toxicidad aguda o de otros estudios (por ejemplo, de toxicocinética), se deduce que es preferible utilizar otros tiempos de sacrificio tras la última administración, entonces deberán aplicarse estos tiempos aportando la justificación pertinente.

También pueden hacerse análisis de la acetilcolinesterasa (ACE) con estas muestras, si se considera conveniente. No obstante, puede darse *in vivo* una reactivación espontánea de la ACE, llevando así a una subestimación de la potencia de la sustancia como inhibidora de la ACE.

▼B

1.4.3.4. *Autopsia macroscópica*

La autopsia macroscópica de todos los animales (sacrificados de forma programada y sacrificados por encontrarse moribundos) debe incluir la observación del aspecto del cerebro y de la médula espinal.

1.4.3.5. *Examen histopatológico*

Se someterán a examen microscópico muestras de tejido nervioso de los animales supervivientes al final del período de observación que no se hayan utilizado en los estudios bioquímicos. Los tejidos se fijarán *in situ,* utilizando técnicas de perfusión. Las secciones serán del cerebelo (nivel medio longitudinal), bulbo raquídeo, médula espinal y nervios periféricos. Las secciones de la médula espinal deben tomarse del segmento cervical superior y de las regiones media-dorsal y lumbo-sacra. Deben tomarse también secciones de la región distal del nervio tibial y sus ramificaciones al músculo gastrocnemio y del nervio ciático. Las secciones se someterán a tinción con colorantes adecuados específicos de la mielina y del axón. En principio, debe hacerse el examen microscópico de los tejidos conservados de todos los animales de los lotes de control y de dosis alta. Cuando haya pruebas de efectos en el lote de dosis alta, deberá hacerse también el examen microscópico de las gallinas de los lotes de dosis intermedia y baja.

2. **RESULTADOS**

La obtención de resultados negativos respecto a los parámetros seleccionados en este método (bioquímica, histopatología y observación del comportamiento) no requiere normalmente la realización de más ensayos de neurotoxicidad retardada. La obtención de resultados dudosos o ambiguos respecto a estos parámetros sí puede hacer necesaria otra evaluación.

Deben proporcionarse datos individuales. Además, todos los datos deben resumirse en forma tabular, indicando para cada lote de ensayo el número de animales al inicio de la prueba, el número de animales que presenten lesiones o efectos bioquímicos o de comportamiento, los tipos y gravedad de estas alteraciones, y el porcentaje de animales que presenten cada tipo y grado de alteración.

Las observaciones del presente estudio deben evaluarse en términos de incidencia, gravedad y correlación de los efectos bioquímicos, histopatológicos y de comportamiento, así como cualquier otro efecto observado en los lotes tratados y de control.

Los resultados numéricos deben evaluarse mediante métodos estadísticos adecuados de aceptación general. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

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

Animales de ensayo:

— variedad utilizada,

— número y edad de los animales,

— origen, condiciones de alojamiento, etc.,

— peso de cada animal al inicio de la prueba.

▼B

Condiciones del ensayo:

— datos sobre la preparación, estabilidad y homogeneidad de la sustancia estudiada, cuando convenga,

— justificación de la elección del vehículo,

— datos sobre la administración de la sustancia estudiada,

— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua,

— justificación de la selección de la dosis,

— especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado,

— justificación de la elección de los tiempos para las determinaciones bioquímicas, en caso de que no sean 24 y 48 horas.

Resultados:

— datos sobre el peso corporal,

— datos de la respuesta tóxica por lotes, incluida la mortalidad,

— nivel sin efectos adversos observados,

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (tanto si son reversibles como si no),

— descripción detallada de los métodos y observaciones bioquímicas,

— observaciones de la autopsia,

— descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas,

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados

Conclusiones

4. **REFERENCIAS**

El presente método es análogo a la TG 419 de la OCDE.

▼B

## B.39. ENSAYO DE SÍNTESIS DE ADN NO PROGRAMADA (UDS) EN HEPATOCITOS DE MAMÍFERO *IN VIVO*

### 1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices del documento OCDE TG 486 sobre el ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero *in vivo* (1997).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El ensayo de síntesis de ADN no programada (UDS) en hepatocitos de mamífero *in vivo* tiene por objeto determinar sustancias de ensayo que inducen la reparación del ADN en los hepatocitos de animales tratados (1) (2) (3) (4).

El presente ensayo *in vivo* constituye un método de investigación de los efectos genotóxicos de los productos químicos en el hígado y sirve para detectar lesiones en el ADN y su posterior reparación en las células hepáticas. El hígado suele ser el lugar donde más se metabolizan los compuestos absorbidos y por ello constituye el órgano más apropiado para la detección de lesiones del ADN *in vivo*.

Si hay pruebas de que la sustancia de ensayo no llega al tejido diana, no procede realizar el presente ensayo.

La síntesis de ADN no programada (UDS) se determina midiendo la incorporación de nucleósidos marcados en células que no se encuentran en la fase S de síntesis programada de ADN. La técnica más empleada consiste en determinar la captación de timidina tritiada ($^3$H-TdR) por autorradiografía. Para los ensayos de UDS *in vivo* es preferible utilizar hígados de rata. También pueden emplearse otros tejidos, si bien no se tratan en las presentes directrices.

La detección de una respuesta de UDS depende del número de bases del ADN eliminadas y repuestas en el sitio de la lesión. De ahí que el ensayo de UDS sea particularmente útil para detectar la reparación de secuencias largas (20 a 30 bases; secuencias largas de reparación) inducida por una sustancia. Sin embargo, la sensibilidad del ensayo para detectar la reparación de secuencias cortas (1 a 3 bases; secuencias cortas de reparación) es mucho menor. Por otra parte, las alteraciones mutagénicas pueden deberse a una falta de reparación o a una reparación o replicación erróneas de las lesiones del ADN. La magnitud de la respuesta de UDS no es indicativa de la fidelidad del proceso de reparación. Además de ello, es posible que un mutágeno reaccione con el ADN, pero que la lesión de este no se repare por un mecanismo de reparación de escisión. La falta de información específica sobre la actividad mutagénica que caracteriza al ensayo UDS se ve compensada por su sensibilidad potencial, ya que detecta los efectos en todo el genoma.

Véase asimismo la Introducción general de la parte B.

### 1.2. DEFINICIONES

**Células en reparación:** células con un número neto de granulaciones nucleares (NGN) superior a un número preestablecido que el laboratorio donde se realiza el ensayo ha de fundamentar.

**Número neto de granulaciones nucleares (NGN):** medida cuantitativa de la síntesis de ADN no programada en las células por autorradiografía: se calcula restando el número medio de granulaciones citoplasmáti-cas (GC) en las zonas citoplasmáticas equivalentes al núcleo del número de granulaciones nucleares (GN): NGN = GN - GC. Primero se calcula el NGN de cada célula y después el correspondiente a todo un cultivo o a cultivos paralelos, etc.

▼B

**Síntesis de ADN no programada (UDS):** síntesis de reparación de ADN tras la escisión y eliminación de un segmento de ADN que contiene una región dañada por sustancias químicas o agentes físicos.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* detecta la síntesis de reparación del ADN tras la escisión y eliminación de un segmento de ADN que contiene una región dañada por sustancias químicas o agentes físicos. El ensayo suele fundarse en la incorporación de $^{3}$H-TdR al ADN de hepatocitos de los cuales una escasa proporción se encuentra en la fase S del ciclo celular. La incorporación de $^{3}$H-TdR suele determinarse por autorradiografía, ya que esta técnica no es tan sensible a las interferencias debidas a las células en fase S como lo es, por ejemplo, el recuento por centelleo de líquidos.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Selección de la especie animal*

Si bien suelen emplearse ratas, pueden utilizarse otras especies de mamíferos apropiadas. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo.

1.4.1.2. *Alojamiento y alimentación de los animales*

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

1.4.1.3. *Preparación de los animales*

Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los lotes tratados y los lotes de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos 5 días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

1.4.1.4. *Preparación de la sustancia de ensayo*

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

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Disolvente o vehículo*

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

▼B

1.4.2.2. *Controles*

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

En los controles positivos se emplearán sustancias de las que se sepa que inducen la síntesis de ADN no programada cuando se administran en dosis con las que se prevé un aumento detectable respecto a la frecuencia espontánea. Los controles positivos que requieran activación metabólica se realizarán con dosis que provoquen una respuesta moderada (4). Las dosis del control positivo pueden ser tales que los efectos sean claros, pero no revelen inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados. A continuación figuran algunos ejemplos de sustancias para los controles positivos:

| Período de muestreo | Sustancia | Nº CAS | Nº EINECS |
|---|---|---|---|
| Corto (2 a 4 horas) | N-nitrosodimetilamina | 62-75-9 | 200-249-8 |
| Largo (12 a 16 horas) | N-2-fluorenilacetamida (2-AAF) | 53-96-3 | 200-188-6 |

Pueden emplearse otras sustancias adecuadas para los controles positivos. La sustancia del control positivo puede administrarse por una vía distinta de la de la sustancia de ensayo.

1.5. PROCEDIMIENTO

1.5.1. **Número y sexo de los animales**

El número de animales deberá decidirse tomando en consideración la variación biológica natural de la respuesta al ensayo. Cada lote estará constituido al menos por 3 animales analizables. Si se dispone de una base de datos de controles históricos importante, bastarán 1 o 2 animales para los lotes de los controles negativos y positivos realizados en paralelo.

Si en el momento en que se efectúe el estudio se dispone de datos sobre otros estudios realizados con la misma especie y la misma vía de exposición, que demuestren que no hay diferencia significativa entre sexos en cuanto a la toxicidad, será suficiente el ensayo en un solo sexo, preferiblemente en machos. En caso de que la exposición humana a sustancias químicas pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo se realizará con animales del sexo correspondiente.

1.5.2. **Pauta de tratamiento**

Las sustancias de ensayo suelen administrarse en una sola vez.

1.5.3. **Dosis**

En principio, se administran al menos dos dosis distintas. Se entiende por «dosis máxima» la que produce tales signos de toxicidad que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo, resultaría probablemente letal. Por lo general, la dosis inferior es del 50 % al 25 % de la dosis máxima.

▼B

Las sustancias con actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (como las hormonas y los mitó-genos) pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso. Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación de la gama de dosis por falta de datos adecuados, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y protocolo de tratamiento que el estudio principal.

La dosis máxima también puede definirse como la dosis que produce algún signo de toxicidad hepática (por ejemplo, núcleos picnóticos).

1.5.4. **Ensayo límite**

Si en un ensayo realizado con una dosis de al menos 2 000 mg/kg de peso corporal administrada en una sola vez, o dos veces en el mismo día, no se observan efectos tóxicos y si, sobre la base de datos relativos a sustancias de estructura afín, no cabe esperar genotoxicidad, puede no ser necesario llevar a cabo un estudio completo. Si se prevé la exposición humana a la sustancia, puede ser preciso administrar una dosis mayor en el ensayo límite.

1.5.5. **Administración de las dosis**

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

1.5.6. **Preparación de los hepatocitos**

Se extraen hepatocitos de los animales tratados, por lo general de 12 a 16 horas después de la administración de la sustancia de ensayo. Suele ser necesaria otra toma previa (generalmente de 2 a 4 horas después del tratamiento), salvo que a las 12-16 horas haya una respuesta positiva clara. No obstante, pueden aplicarse otros períodos de muestreo, si así lo justifican los datos toxicocinéticos.

Los cultivos de hepatocitos de mamífero a corto plazo se realizan perfundiendo el hígado *in situ* con colage-nasa y dejando que los hepatocitos recién disociados se adhieran a una superficie adecuada. La viabilidad de los hepatocitos de los animales del control negativo ha de ser del 50 % como mínimo (5).

1.5.7. **Determinación de la síntesis de ADN no programada**

Los hepatocitos de mamífero recién aislados se incuban en un medio con $^{3}$H-TdR durante un tiempo adecuado, por ejemplo, de 3 a 8 horas. Al término de la incubación, se retiran las células del medio y pueden entonces incubarse en otro medio con un exceso de timidina sin tratar con el fin de reducir la radiactividad no incorporada *(cold chase)*. A continuación, se aclaran las células, se fijan y se tiñen. Esta segunda incubación puede no ser necesaria si la primera ha sido más larga. Se bañan los portaobjetos en una emulsión auto-rradiográfica, se exponen en la oscuridad (por ejemplo, refrigerados, de 7 a 17 días), se revelan y tiñen y se cuentan los granos de plata expuestos. Se preparan dos o tres portaobjetos por animal.

▼B

1.5.8. **Análisis**

Las preparaciones han de contener un número suficiente de células de morfología normal para que la evaluación de la síntesis de ADN no programada sea significativa.

Se observan las preparaciones al microscopio en busca de signos de citotoxicidad manifiesta (por ejemplo, picnosis, índice reducido de marcado radiactivo, etc.).

Se codifican los portaobjetos antes del recuento de granulaciones. Por lo general, se cuentan 100 células por animal, en dos portaobjetos como mínimo. El recuento de menos de 100 células por animal deberá estar debidamente justificado. Si bien los núcleos en fase S no se consideran en el recuento de granulaciones, puede registrarse la proporción de células en fase S.

Se determinará con métodos apropiados la cantidad de $^{3}$H-TdR incorporada en los núcleos y el citoplasma de las células con morfología normal, revelada por el depósito de granos de plata.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Se proporcionarán los datos de cada portaobjetos y de cada animal. Se resumirán todos los datos en forma de tabla. Se calculará el número neto de granulaciones nucleares (NGN) por célula, por animal y por dosis y tiempo restando el número de GC del de GN. Si se cuentan las células en reparación, se motivará el criterio aplicado para definir las «células en reparación», que deberá fundarse en datos relativos a controles históricos negativos o realizados en paralelo al ensayo. Los resultados numéricos pueden evaluarse por medio de métodos estadísticos, que deberán seleccionarse y justificarse antes de llevar a cabo el estudio.

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Entre los criterios para determinar si una respuesta es positiva o negativa se encuentran los siguientes:

respuesta positiva:
- i) el NGN es superior a un valor preestablecido fundado en datos de controles históricos obtenidos en el laboratorio, o
- ii) el NGN supera de forma significativa al de los controles realizados en paralelo;

respuesta negativa:
- i) el NGN no supera el umbral correspondiente a controles históricos, o
- ii) el NGN no supera de forma significativa al de los controles realizados en paralelo.

▼B

Debe considerarse la importancia biológica de los resultados. Se tomarán en consideración, por ejemplo, la variabilidad entre animales, la relación dosis-respuesta y la citotoxicidad. Pueden emplearse métodos estadísticos como apoyo para evaluar los resultados del ensayo. El hecho de que los datos estadísticos sean significativos no ha de ser el único factor para determinar que una respuesta es positiva.

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

Un resultado positivo en el ensayo de síntesis de ADN no programada en hepatocitos de mamífero *in vivo* indica que la sustancia de ensayo provoca lesiones del ADN en los hepatocitos de mamífero *in vivo* que pueden repararse por síntesis de ADN no programada *in vitro*. Un resultado negativo indica que, en las condiciones del ensayo, la sustancia de ensayo no provoca lesiones del ADN detectables mediante este ensayo.

Deberá estudiarse la probabilidad de que la sustancia de ensayo pase al torrente circulatorio o llegue específicamente al tejido diana (toxicidad sistémica, etc.).

3. **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

Disolvente o vehículo:

— motivación de la elección del vehículo,

— solubilidad y estabilidad de la sustancia de ensayo en el disolvente o vehículo, si se conocen.

Animales de ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, alimentación, etc.,

— peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo del peso corporal, media y desviación estándar de cada lote.

Condiciones del ensayo:

— controles positivos y negativos (vehículo o disolvente),

— datos relativos al estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo,

— fundamento de la selección de la dosis,

— preparación de la sustancia de ensayo,

— administración de la sustancia de ensayo,

— fundamento de la elección de la vía de administración,

— métodos de comprobación de que la sustancia de ensayo llega al torrente circulatorio o al tejido diana, en su caso,

▼B

— conversión de la concentración de la sustancia de ensayo en el agua ingerida y/o la dieta (ppm) en la dosis real (mg/kg de peso corporal/día), si procede,

— calidad de los alimentos y el agua,

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— métodos de preparación y cultivo de los hepatocitos,

— técnica autorradiográfica utilizada,

— criterios de evaluación,

— criterios empleados para considerar que los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos.

Resultados:

— media de granulaciones nucleares, granulaciones citoplasmáticas y granulaciones nucleares netas por portaobjetos, animal y lote,

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible,

— evaluación estadística, si se ha realizado,

— signos de toxicidad,

— datos de los controles negativos (disolvente o vehículo) y positivos realizados en paralelo,

— datos de controles históricos negativos (disolvente o vehículo) y positivos, intervalos, medias y desviaciones estándar,

— número de «células en reparación», si se ha determinado,

— número de células en fase S, si se ha determinado,

— viabilidad de las células.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

(1) Ashby, J., Lefevre, F. A., Burlinson, B. and Penman, M. G. (1985), An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Miuation Res.,* 156, pp. 1-18.

(2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermúdez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay, *Mutation* Res., *189,* pp. 123-133.

(3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds.), *Suppkmentary Mutage-nicity* Tests; U*KEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing Repon. Part II revised,* Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

(4) Madle, S., Dean, S. W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and *In Vivo, Mutations Res,* 312, pp. 263-285.

(5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Bet-ween the Initital Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS), *Mutation* Res., *291,* pp. 21-27.

(6) Mirsalis, J. C, Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay, *Environ Mutagen,* 4, pp. 553-562.

▼M8

## B.40. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO DE RESISTENCIA ELÉCTRICA TRANSCUTÁNEA (RET)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 430 de la OCDE (2015). La corrosión cutánea se refiere a la producción de una lesión irreversible en la piel, que se manifiesta como necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, tras la aplicación de un producto problema [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y del Reglamento (UE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea ([1])]. El presente método de ensayo B.40 actualizado establece un procedimiento *in vitro* que permite la identificación de sustancias y mezclas no corrosivas y corrosivas con arreglo al SGA de las Naciones Unidas (1) y al CLP.

2. La evaluación de la corrosividad cutánea suele implicar el uso de animales de laboratorio (método B.4, equivalente a las directrices de ensayo TG 404 de la OCDE, adoptadas originalmente en 1981 y revisadas en 1992, 2002 y 2015) (2). Además del presente método de ensayo B.40, se han validado otros métodos de ensayo *in vitro* para detectar el potencial de corrosión cutánea de los productos químicos, y se han adoptado como método de ensayo B.40 *bis* (equivalente a las directrices de ensayo TG 431 de la OCDE) (3) y método de ensayo B.65 (equivalente a las directrices de ensayo TG 435 de la OCDE) (4), que también pueden identificar subcategorías de productos químicos corrosivos cuando sea necesario. Varios métodos de ensayo *in vitro* validados se han adoptado como método de ensayo B.46 (equivalente a las directrices de ensayo TG 439 de la OCDE) (5), para utilizarlo en el ensayo de irritación cutánea. Un documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) describe varios módulos que agrupan diversas fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aporta orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) propone un enfoque cuando se precisan más ensayos (6).

3. El presente método de ensayo se refiere al parámetro de salud humana denominado irritación cutánea. Se basa en el método de ensayo de la resistencia eléctrica transcutánea en piel de rata (RET), que utiliza discos de piel para detectar sustancias corrosivas por su capacidad de provocar una pérdida de la integridad y de la función de barrera del estrato córneo normal. Las directrices de ensayo correspondientes de la OCDE se adoptaron originalmente en 2004 y se actualizaron en 2015 para referirse al documento de orientación sobre los IATA.

4. Para evaluar los ensayos de corrosión cutánea *in vitro* con fines normativos, se llevaron a cabo estudios de prevalidación (7), seguidos de un estudio formal de validación del método de ensayo RET con piel de rata para evaluar la corrosión cutánea (8) (9) (10) (11). El resultado de estos estudios

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M8**

llevó a la recomendación de que el método de ensayo RET (designado como el método de referencia validado, MRV) podía utilizarse con fines normativos para la evaluación de la corrosividad cutánea *in vivo* (12) (13) (14).

5. Antes de que pueda utilizarse con fines normativos para evaluar la corrosión cutánea un método de ensayo RET *in vitro* similar o modificado distinto del MRV, deben determinarse su fiabilidad, pertinencia (exactitud) y limitaciones para el uso propuesto, a fin de garantizar su similitud con el MRV, de acuerdo con los requisitos de las normas de comportamiento (15). La aceptación mutua de datos por la OCDE solo se garantizará tras la revisión y la inclusión en las directrices de ensayo correspondientes de la OCDE de cualquier método de ensayo nuevo o actualizado propuesto.

DEFINICIONES

6. En el apéndice se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES

7. Un estudio de validación (10) y otros estudios publicados (16) (17) han comunicado que el método de ensayo RET con piel de rata puede discriminar entre agentes conocidos corrosivos y no corrosivos para la piel, con una sensibilidad global del 94 % (51/54) y una especificidad del 71 % (48/68) en relación con una base de datos de 122 sustancias.

8. El presente método de ensayo aborda la corrosión cutánea *in vitro*. Permite la identificación de productos problema no corrosivos y corrosivos, de conformidad con el SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Una limitación de este método de ensayo, demostrada por los estudios de validación (8) (9) (10) (11), es que no permite la subcategorización de sustancias y mezclas corrosivas de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP. El marco normativo aplicable determinará cómo se utilizará el presente método de ensayo. Aunque este no proporciona información adecuada sobre la irritación cutánea, cabe señalar que el método de ensayo B.46 aborda específicamente el aspecto de la irritación cutánea *in vitro* (5). Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una exposición cutánea única, debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los IATA (6).

9. Durante la validación en que se basa el presente método se ha sometido a ensayo una amplia variedad de productos químicos que representan principalmente sustancias, y la base de datos empíricos del estudio de validación contaba con 60 sustancias que cubrían una amplia gama de clases químicas (8) (9). Sobre la base del conjunto de datos disponibles, el método de ensayo es aplicable a una amplia gama de clases químicas y estados físicos, incluidos líquidos, semisólidos, sólidos y ceras. Sin embargo, dado que para ciertos estados físicos específicos no se dispone fácilmente de productos de ensayo con datos de referencia adecuados, hay que señalar que durante la validación se evaluó un número relativamente pequeño de ceras y de sólidos corrosivos. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. En los casos en que haya pruebas sobre la inaplicabilidad del método de ensayo a una determinada categoría de sustancias, el método no deberá utilizarse con tal categoría específica de sustancias. Además, se supone que este método de ensayo es aplicable a las mezclas como una extensión de su aplicabilidad a las sustancias. Sin embargo, debido al hecho de que las mezclas abarcan un amplio espectro de categorías y composiciones, y que actualmente se dispone de información solo limitada sobre los ensayos de mezclas, en los casos en los que pueda demostrarse la inaplicabilidad del método de ensayo a una determinada categoría de mezclas (por ejemplo, a raíz de una estrategia como la propuesta por Eskes *et al*., 2012) (18), el método no deberá utilizarse con tal categoría específica de mezclas. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos

▼M8

estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo. Aún no se han efectuado estudios de validación de gases y aerosoles (8) (9). Aunque no hay que descartar que estos tipos de productos puedan estudiarse utilizando el método de ensayo RET, el método actual no permite ensayar gases ni aerosoles.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. El producto problema se aplica durante un máximo de 24 horas en la superficie epidérmica de discos de piel en un sistema de ensayo bicompartimental, donde los discos hacen de separación entre los compartimentos. Los discos de piel se toman de ratas, sacrificadas de forma compasiva a los 28 o 30 días de edad. Las sustancias corrosivas se caracterizan por su capacidad de producir una pérdida de la integridad y de la función de barrera del estrato córneo normal, pérdida que se mide como reducción de la RET por debajo de un umbral (32). En relación con la RET de ratas, se ha elegido un valor límite de 5 kΩ basándose en muchos datos sobre una amplia gama de sustancias, de las que la gran mayoría presentaba unos valores claramente bien por encima (a menudo > 10 kΩ) o bien por debajo (a menudo < 3 kΩ) de este valor (16). Generalmente, los productos problema que no son corrosivos para los animales, tanto si son irritantes como si no, no reducen el valor de la RET por debajo de este límite. Por otra parte, el uso de otros preparados de piel o de otros equipos puede alterar el valor límite, lo que haría necesaria otra validación.

11. Se incorpora al procedimiento una fase de fijación de colorante para confirmar los resultados positivos con la RET, incluidos los casos de valores próximos a 5 kΩ. La fase de fijación del colorante determina si el aumento de la permeabilidad iónica se debe a la destrucción física del estrato córneo. Se ha visto que el método RET con piel de rata sirve para predecir el valor de la corrosividad del conejo *in vivo*, evaluada según el método de ensayo B.4 (2).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

12. Antes de proceder al uso sistemático del método de ensayo RET con piel de rata, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta clasificación de las doce sustancias para la prueba de la competencia recomendadas en el cuadro 1. Cuando una sustancia de la lista no esté disponible o en casos justificados, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* [por ejemplo, de la lista de productos de referencia (16)] siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los descritos en el cuadro 1.

*Cuadro 1*

**Lista de sustancias para la prueba de la competencia** (1)

| Sustancia | N.º CAS | Clase química (2) | Cat. según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP basada en resultados *in vivo* (3) | Cat. según los resultados del MRV *in vitro* (3) | Estado físico | pH (4) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Corrosivos *in vivo* | | | | | | |
| N,N'-Dimetil-dipropilentriamina | 10563-29-8 | Base orgánica | 1A | 6 × C | L | 8,3 |
| 1,2-Diaminopropano | 78-90-0 | Base orgánica | 1A | 6 × C | L | 8,3 |

▼**M8**

| Sustancia | N.º CAS | Clase química ([2]) | Cat. según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP basada en resultados *in vivo* ([3]) | Cat. según los resultados del MRV *in vitro* ([3]) | Estado físico | pH ([4]) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Corrosivos *in vivo* | | | | | | |
| Ácido sulfúrico (10 %) | 7664-93-9 | Ácido inorgánico | (1A/)1B/1C | 5 × C<br>1 × NC | L | 1,2 |
| Hidróxido de potasio (ac. al 10 %) | 1310-58-3 | Base inorgánica | (1A/)1B/1C | 6 × C | L | 13,2 |
| Ácido octanoico (caprílico) | 124-07-2 | Ácido orgánico | 1B/1C | 4 × C<br>2 × NC | L | 3,6 |
| 2-*terc*-Butilfenol | 88-18-6 | Fenol | 1B/1C | 4 × C<br>2 × NC | L | 3,9 |
| No corrosivos *in vivo* | | | | | | |
| Ácido isoesteárico | 2724-58-5 | Ácido orgánico | NC | 6 × NC | L | 3,6 |
| 4-Amino-1,2,4-triazol | 584-13-4 | Base orgánica | NC | 6 × NC | S | 5,5 |
| Bromuro de fenetilo | 103-63-9 | Electrófilo | NC | 6 × NC | L | 3,6 |
| 4-(Metiltio)-benzaldehído | 3446-89-7 | Electrófilo | NC | 6 × NC | L | 6,8 |
| 1,9-Decadieno | 1647-16-1 | Orgánico neutro | NC | 6 × NC | L | 3,9 |
| Tetracloroetileno | 127-18-4 | Orgánico neutro | NC | 6 × NC | L | 4,5 |

Abreviaturas: ac = solución acuosa; N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; MRV = método de referencia validado; C = corrosivo; NC = no corrosivo.

([1]) Las sustancias para la prueba de la competencia se seleccionaron de entre las sustancias utilizadas en el estudio de validación del CEVMA del método de ensayo RET con piel de rata, utilizando primero el criterio de corrosivas frente a no corrosivas, después el de subcategoría de corrosivas y finalmente el de clase química (8) (9). Salvo que se indique lo contrario, las sustancias se sometieron a prueba al nivel de pureza obtenido cuando se compran de una fuente comercial (8). En la selección se incluyeron, en la medida de lo posible, sustancias que: i) son representativas de la gama de respuestas de corrosividad (p. ej., sustancias no corrosivas; sustancias débilmente corrosivas a fuertemente corrosivas) que el MRV puede medir o predecir; ii) son representativas de las clases químicas utilizadas en el estudio de validación; iii) reflejan las características de comportamiento del MRV; iv) tienen estructuras químicas bien definidas; v) dan resultados definitivos con el método de ensayo de referencia *in vivo*; vi) están disponibles en el comercio; y vii) no tienen asociados costes de eliminación prohibitivos.

([2]) Clase química asignada por Barratt *et al.* (8).

([3]) Los grupos de embalaje de las Naciones Unidas correspondientes son I, II y III, respectivamente, respecto a las categorías 1A, 1B y 1C del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

([4]) Los valores de pH se obtuvieron de Fentem *et al.* (9) y de Barratt *et al.* (8).

▼M8

PROCEDIMIENTO

13. Se dispone de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para el método de ensayo de corrosión cutánea RET con piel de rata (19). Los métodos de ensayo RET con piel de rata contemplados en el presente método de ensayo deben cumplir las condiciones siguientes:

**Animales**

14. Deben utilizarse ratas porque la sensibilidad de su piel a las sustancias consideradas en el presente método de ensayo se ha demostrado previamente (12) y es la única fuente de piel que se ha validado oficialmente (8) (9). La edad (en el momento de tomar la piel) y la cepa de la rata son especialmente importantes para conseguir que los folículos pilosos estén en fase latente antes de que se inicie el crecimiento del pelo de los adultos.

15. Se quita cuidadosamente con maquinilla pequeña el pelo dorsal y lateral de ratas jóvenes, de unos 22 días de edad, machos o hembras, de una cepa derivada de la Wistar o de otra comparable. A continuación se lavan los animales frotándolos cuidadosamente al mismo tiempo que se cubre la zona pelada con una solución antibiótica (que contenga, por ejemplo, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol y anfotericina en concentraciones que sean eficaces para inhibir el crecimiento bacteriano). Los animales se vuelven a lavar con antibióticos al tercer o cuarto día después del primer lavado y se utilizan en el plazo de 3 días desde el segundo lavado, cuando el estrato córneo se ha recuperado de la eliminación del pelo.

**Preparación de los discos de piel**

16. Los animales se sacrifican de forma compasiva cuando tienen entre 28 y 30 días de edad; esta edad es crítica. A continuación se retira la piel dorsolateral de cada animal y se le quita el exceso de grasa subcutánea, separando esta cuidadosamente de la piel. Se toman discos de piel de un diámetro aproximado de 20 mm. Puede guardarse la piel antes de utilizar los discos si se demuestra que los datos obtenidos con controles positivos y negativos son equivalentes a los obtenidos con piel fresca.

17. Cada disco de piel se coloca sobre uno de los extremos de un tubo de PTFE (politetrafluoroetileno), comprobando que la superficie epidérmica esté en contacto con el mismo. Se coloca a presión un anillo de goma en el extremo del tubo para mantener la piel en su sitio y se recorta el tejido sobrante. Después se sella con cuidado el anillo de goma al extremo del tubo de PTFE con vaselina. El tubo se sujeta mediante una pinza de muelle dentro de una cámara receptora que contiene una solución de $MgSO_4$ (154 mM) (figura 1). El disco de piel debe quedar totalmente sumergido en la solución de $MgSO_4$. De la piel de una sola rata pueden obtenerse hasta 10 o 15 discos de piel. En la figura 2 se dan las dimensiones del anillo y del tubo.

18. Antes del inicio de las pruebas, se mide la RET de dos discos de piel, como procedimiento de control de calidad de la piel de cada animal. El valor de la resistencia de ambos discos debe ser superior a 10 kΩ para que los discos restantes puedan utilizarse en el método de ensayo. Si el valor de la resistencia es inferior a 10 kΩ, hay que desechar los discos restantes de la misma piel.

**Aplicación del producto problema y de las sustancias testigo**

19. En cada tanda (experimento) deben utilizarse a la vez testigos positivos y negativos para garantizar el comportamiento adecuado del modelo experimental. Deben utilizarse en cada tanda (experimento) discos de piel procedentes de un solo animal. Las sustancias testigo positivo y negativo que se proponen son ácido clorhídrico 10 M y agua destilada, respectivamente.

▼M8

20. En el caso de los productos problema líquidos, se aplican uniformemente a la superficie epidérmica dentro del tubo 150 µl. Cuando se prueban materias sólidas, se aplica uniformemente al disco una cantidad suficiente del sólido de tal manera que quede cubierta toda la superficie de la epidermis. A continuación se vierte encima del sólido agua desionizada (150 µl) y se agita suavemente el tubo. A fin de conseguir el contacto máximo con la piel, es posible que los sólidos deban calentarse a 30 °C para fundir o reblandecer el producto problema, o bien molerse para obtener polvo o material granuloso.

21. Se utilizan tres discos de piel para cada producto problema y sustancia testigo en cada tanda (experimento) del ensayo. Los productos problema se aplican durante 24 horas a 20-23 °C. El producto problema se elimina lavando con un chorro de agua del grifo a temperatura ambiente hasta que no pueda eliminarse más material.

**Mediciones de la RET**

22. La impedancia de la piel se mide como RET utilizando un puente de Wheatstone de baja tensión y de corriente alterna (18). Las especificaciones generales del puente son una tensión de funcionamiento de 1-3 V, una corriente alterna de forma sinusoidal o rectangular de 50 - 1 000 Hz, y un intervalo de medición como mínimo de 0,1 a -30 kΩ. El puente utilizado en el estudio de validación media valores de inductancia, capacitancia y resistencia de hasta 2 000 H, 2 000 µF, y 2 MΩ, respectivamente, a frecuencias de 100 Hz o 1 kHz, utilizando montajes en serie o en paralelo. A efectos de la RET, las mediciones del ensayo de corrosividad se registran como resistencia, a la frecuencia de 100 Hz y utilizando montajes en serie. Antes de medir la resistencia eléctrica, se reduce la tensión superficial de la piel añadiendo un volumen de etanol al 70 % suficiente para cubrir la epidermis. Tras unos segundos se retira el etanol del tubo y después se hidrata el tejido aplicando 3 ml de una solución de $MgSO_4$ (154 mM). Los electrodos del puente se colocan a ambos lados del disco de piel para medir la resistencia en kΩ/disco de piel (figura 1). En la figura 2 se dan las dimensiones de los electrodos y la longitud del electrodo expuesta por debajo de las pinzas de cocodrilo. La pinza que sujeta el electrodo interior se apoya encima del tubo de PTFE durante la medición de la resistencia para asegurarse de que es constante la longitud del electrodo que queda sumergida en la solución de $MgSO_4$. El electrodo exterior se coloca dentro de la cámara receptora de manera que se apoye en el fondo de la misma. La distancia entre la pinza de muelle y el fondo del tubo de PTFE se ha de mantener constante (figura 2), ya que afecta al valor de la resistencia obtenido. Por tanto, la distancia entre el electrodo interior y el disco de piel debe ser constante y mínima (1-2 mm).

23. Si el valor medido de la resistencia es superior a 20 kΩ, puede deberse a que haya restos del producto problema recubriendo la superficie epidérmica del disco de piel. Puede intentarse mejorar la eliminación de este recubrimiento, por ejemplo sellando el tubo de PTFE con el pulgar cubierto de un guante y agitándolo aproximadamente diez segundos; se descarta la solución de $MgSO_4$ y se repite la medición de la resistencia con nuevo $MgSO_4$.

24. Las propiedades y dimensiones del instrumental y el procedimiento experimental utilizado pueden influir en los valores obtenidos de RET. El umbral de corrosión de 5 kΩ se ha determinado a partir de datos obtenidos con el instrumental y el procedimiento concretos descritos en el presente método. Si se modifican las condiciones del ensayo o se utiliza un instrumental diferente, es posible que deban aplicarse diferentes valores umbral y de los testigos. Por tanto, es necesario calibrar el método y los valores umbral de resistencia sometiendo a ensayo una serie de sustancias para la prueba de la competencia elegidas de entre las sustancias utilizadas en el estudio de validación (8) (9) o de clases químicas similares a las sustancias problema. En el cuadro 1 se indica una serie de sustancias adecuadas para la prueba de la competencia.

▼M8

**Métodos de fijación de colorante**

25. La exposición a determinados materiales no corrosivos puede dar lugar a una reducción de la resistencia por debajo del umbral de 5 kΩ por permitir el paso de iones a través del estrato córneo, reduciendo así la resistencia eléctrica (9). Por ejemplo, las sustancias orgánicas neutras y las que tienen propiedades tensoactivas (incluidos los detergentes, emulgentes y otros agentes tensoactivos) pueden eliminar lípidos cutáneos, lo que aumenta la permeabilidad de la barrera a los iones. Así pues, si los valores de RET obtenidos con tales productos están por debajo o cerca de 5 kΩ, sin que visualmente se aprecien lesiones en los discos de piel, deberá efectuarse una evaluación de la penetración de colorante en los tejidos tratado y testigo, a fin de determinar si los valores de RET obtenidos son resultado de un aumento de la permeabilidad de la piel o bien de la corrosión de esta (7) (9). En este último caso, si el estrato córneo está erosionado, el colorante sulforrodamina B aplicado a la superficie de la piel penetra rápidamente en el tejido subyacente y lo tiñe. Este colorante en particular es estable ante una amplia gama de sustancias y no se ve afectado por el procedimiento de extracción que se describe más abajo.

**Aplicación y eliminación del colorante sulforrodamina B**

26. Tras la evaluación de la RET, se retira el sulfato de magnesio del tubo y se examina cuidadosamente la piel para detectar la presencia de lesiones evidentes. Si no hay ninguna lesión importante evidente (p. ej., una perforación), se aplican durante 2 horas en la superficie epidérmica de cada disco de piel 150 µl de una disolución al 10 % (p/v) en agua destilada del colorante sulforrodamina B (Acid Red 52; C.I. 45100; n.º CAS 3520-42-1). Después se lavan estos discos de piel con agua del grifo, durante unos 10 segundos y a temperatura no superior a la ambiente, para eliminar el exceso de colorante no fijado. Cada disco de piel se retira cuidadosamente del tubo de PTFE y se coloca en un frasco (por ejemplo, un frasco de cristal de centelleo de 20 ml) con agua desionizada (8 ml). Los frascos se agitan suavemente durante 5 minutos para eliminar los eventuales restos de colorante no fijado. Este procedimiento de aclarado se repite a continuación, después de lo cual se retiran losdiscos cutáneos y se colocan en frascos que contengan 5 ml de dodecilsulfato sódico (DSS) al 30 % (p/v) en agua destilada y se dejan incubar una noche a 60 °C.

27. Después de la incubación, se retiran y desechan los discos de piel y la solución restante se centrifuga durante 8 minutos a 21 °C (fuerza centrífuga relativa ~175 × g). Luego, se diluye de 1 a 5 (v/v) [es decir, 1 ml + 4 ml] una alícuota de 1 ml del sobrenadante con dodecilsulfato sódico al 30 % (p/v) en agua destilada. Se mide la densidad óptica (DO) de la solución a 565 nm.

**Cálculo del contenido de colorante**

28. El contenido en colorante sulforrodamina B por disco se calcula a partir de los valores de DO (9) (coeficiente de extinción molar del colorante sulforrodamina B a 565 nm = $8{,}7 \times l0^4$; peso molecular = 580). Se determina el contenido de colorante de cada disco de piel utilizando una curva de calibración adecuada, y después se calcula la media del contenido de colorante de las muestras paralelas.

**Criterios de aceptabilidad**

29. Los resultados medios de la RET se aceptan a condición de que los valores de los testigos positivos y negativos correspondientes queden dentro de los intervalos aceptables para el método en el laboratorio de ensayo. Los intervalos aceptables de resistencia con el método y con el instrumental antes descritos se indican en el cuadro siguiente:

▼**M8**

| Testigo | Sustancia | Intervalo de resistencia (kΩ) |
|---|---|---|
| Positivo | Ácido clorhídrico 10 M | 0,5 - 1,0 |
| Negativo | Agua destilada | 10 - 25 |

30. Los resultados medios de fijación del colorante se aceptan a condición de que los valores de los testigos correspondientes queden dentro de los intervalos aceptables para el método. En el cuadro siguiente se dan los intervalos de contenido de colorante aceptables que se proponen para las sustancias testigo con el método y el instrumental antes descritos:

| Testigo | Sustancia | Intervalo del contenido de colorante (µg/disco) |
|---|---|---|
| Positivo | Ácido clorhídrico 10 M | 40 - 100 |
| Negativo | Agua destilada | 15 - 35 |

**Interpretación de los resultados**

31. El valor límite de la RET que separa los productos corrosivos de los no corrosivos se estableció durante la optimización del método de ensayo, se sometió a prueba durante una fase de validación previa y se confirmó en un estudio formal de validación.

32. A continuación se recoge el modelo de predicción del método de ensayo RET de corrosión cutánea con piel de rata (9) (19), asociado al sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas y del CLP:

Se considera que el producto problema no es corrosivo para la piel:

i) si el valor medio de RET que se ha obtenido con el producto problema es superior a (>) 5 kΩ, o

ii) si el valor medio de RET que se ha obtenido con el producto problema es inferior o igual a (≤) 5 kΩ, y

— los discos de piel no presentan lesiones evidentes (por ejemplo, una perforación), y

— el contenido medio de colorante del disco es inferior (<) al contenido medio de colorante del disco del testigo positivo de HCl 10 M obtenido en paralelo (véase el punto 30 respecto a los valores de los testigos positivos).

Se considera que el producto problema es corrosivo para la piel:

i) si el valor medio de RET que se ha obtenido con el producto problema es inferior o igual a (≤) 5 kΩ y los discos de piel tienen lesiones evidentes (p. ej., están perforados), o

ii) si el valor medio de RET que se ha obtenido con el producto problema es inferior o igual a (≤) 5 kΩ, y

— los discos de piel no presentan lesiones evidentes (p. ej., una perforación), pero

▼M8

— el contenido medio de colorante del disco es superior o igual (≥) al contenido medio de colorante del disco del testigo positivo de HCl 10 M obtenido en paralelo (véase el punto 30 respecto a los valores de los testigos positivos).

33. Una sola tanda (experimento) del ensayo, formada por al menos tres réplicas de discos de piel, debería ser suficiente para un producto problema, si la clasificación es clara. Sin embargo, en caso de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas o el de una RET media igual a 5 ± 0,5 kΩ, debe plantearse la conveniencia de efectuar una segunda tanda (experimento), así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras tandas (experimentos).

DATOS E INFORME

**Datos**

34. Deben indicarse en un cuadro los valores de resistencia (kΩ) y los valores de contenido de colorante (μg/disco), en su caso, correspondientes al producto problema, así como a los testigos positivos y negativos, incluyendo los datos de cada réplica de los discos en cada tanda (experimento) del ensayo y los valores medios ± DT. Deben recogerse en el informe todos los experimentos repetidos. Se deben notificar las lesiones observadas en los discos de piel en relación con cada producto problema.

**Informe del ensayo**

35. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema y sustancias testigo:*

— Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;

— Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el guion anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— Origen; número de lote, si está disponible;

— Tratamiento del producto problema / sustancia testigo antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha para nuevo análisis, si se conoce;

— Condiciones de conservación.

*Animales de ensayo:*

— Cepa y sexo utilizados;

— Edad de los animales cuando se utilizan como donantes;

— Origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;

— Datos de la preparación de la piel.

▼**M8**

*Condiciones de ensayo:*

— Curvas de calibración del instrumental del ensayo;

— Curvas de calibración sobre el comportamiento del ensayo de fijación de colorante, ancho de banda utilizado para medir los valores de DO, e intervalo de linealidad de la DO del dispositivo de medición (p. ej., espectrofotómetro), si procede;

— Datos del procedimiento utilizado para las mediciones de la RET;

— Datos del procedimiento utilizado para la evaluación de la fijación de colorante, en su caso;

— Dosis utilizadas en el ensayo, duración del período o períodos de exposición y temperatura o temperaturas de exposición;

— Datos sobre el procedimiento de lavado utilizado después del período de exposición;

— Número de réplicas de los discos de piel utilizadas por producto problema y testigos (testigos positivo y negativo);

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;

— Referencia a datos históricos del modelo. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:

  i) Aceptabilidad de los valores de la RET de los testigos positivo y negativo (en kΩ) con referencia a los intervalos de resistencia de los testigos positivo y negativo;

  ii) Aceptabilidad de los valores del contenido en colorantes de los testigos positivo y negativo (en μg/disco) con referencia a los intervalos de contenido en colorantes de los testigos positivo y negativo;

  iii) Aceptabilidad de los resultados de los ensayos con referencia a la variabilidad histórica de las réplicas de discos de piel;

— Descripción de los criterios de decisión / modelo de predicción aplicados.

*Resultados:*

— Cuadro de datos de los ensayos RET y de unión de colorante (si procede) en relación con distintos productos problema y testigos, respecto a cada tanda (experimento) del ensayo y cada réplica de disco de piel (cada animal y cada muestra de piel), promedios, desviaciones típicas y coeficientes de variación;

— Descripción de los eventuales efectos observados;

— Clasificación derivada con referencia al modelo de predicción y/o a los criterios de decisión utilizados.

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2013. Disponible en: [http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html].

▼**M8**

(2) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.

(3) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*.

(4) Capítulo B.65 del presente anexo, Método de ensayo con barrera de membrana *in vitro*.

(5) Capítulo B.46 del presente anexo, Irritación cutánea *in vitro*: Método de ensayo con epidermis humana reconstruida.

(6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 6.*ATLA* 23, 219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and Distribution of the Test Chemicals. *Toxic.In Vitro* 12, 471-482.

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhütter H.-G., and Liebsch M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests For Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. *Toxic.In Vitro*12, 483- 524.

(10) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H., and Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops.*ATLA*23, 129-147.

(11) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(12) EC-ECVAM (1998). Statement on the Scientific Validity of the Rat Skin Transcutaneos Electrical Resistance (TER) Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(13) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275-280.

(14) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM Evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(15) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 430. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 218. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

▼**M8**

(16) Oliver G.J.A., Pemberton M.A., and Rhodes C. (1986). An *In Vitro* Skin Corrosivity Test -Modifications and Validation. Fd. Chem. *Toxicol.* 24, 507-512.

(17) Botham P.A., Hall T.J., Dennett R., McCall J.C., Basketter D.A., Whittle E., Cheeseman M., Esdaile D.J., and Gardner J. (1992). The Skin Corrosivity Test *In Vitro:* Results of an Interlaboratory Trial. *Toxicol*. *In Vitro* 6,191-194.

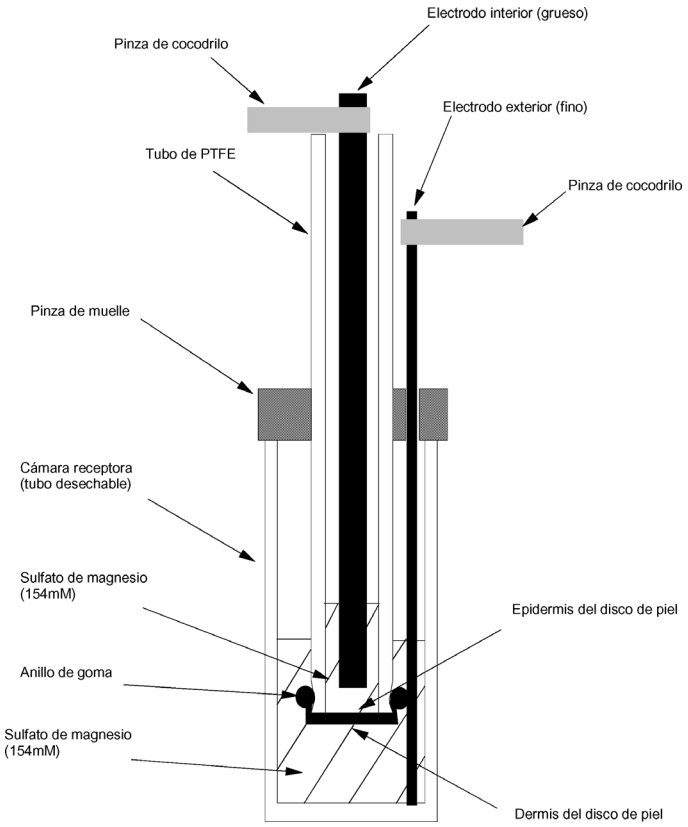
(18) Eskes C., Detappe V., Koëter H., Kreysa J., Liebsch M., Zuang V., Amcoff P., Barroso J., Cotovio J., Guest R., Hermann M., Hoffmann S., Masson P., Alépée N., Arce L.A., Brüschweiler B., Catone T., Cihak R., Clouzeau J., D'Abrosca F., Delveaux C., Derouette J.P., Engelking O., Facchini D., Fröhlicher M., Hofmann M., Hopf N., Molinari J., Oberli A., Ott M., Peter R., Sá-Rocha V.M., Schenk D., Tomicic C., Vanparys P., Verdon B., Wallenhorst T., Winkler G.C. and Depallens O. (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol.Pharmacol.* 62, 393-403.

(19) TER SOP (December 2008). *INVITTOX* Protocol (No 115) Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Test.

(20) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.

*Figura 1*

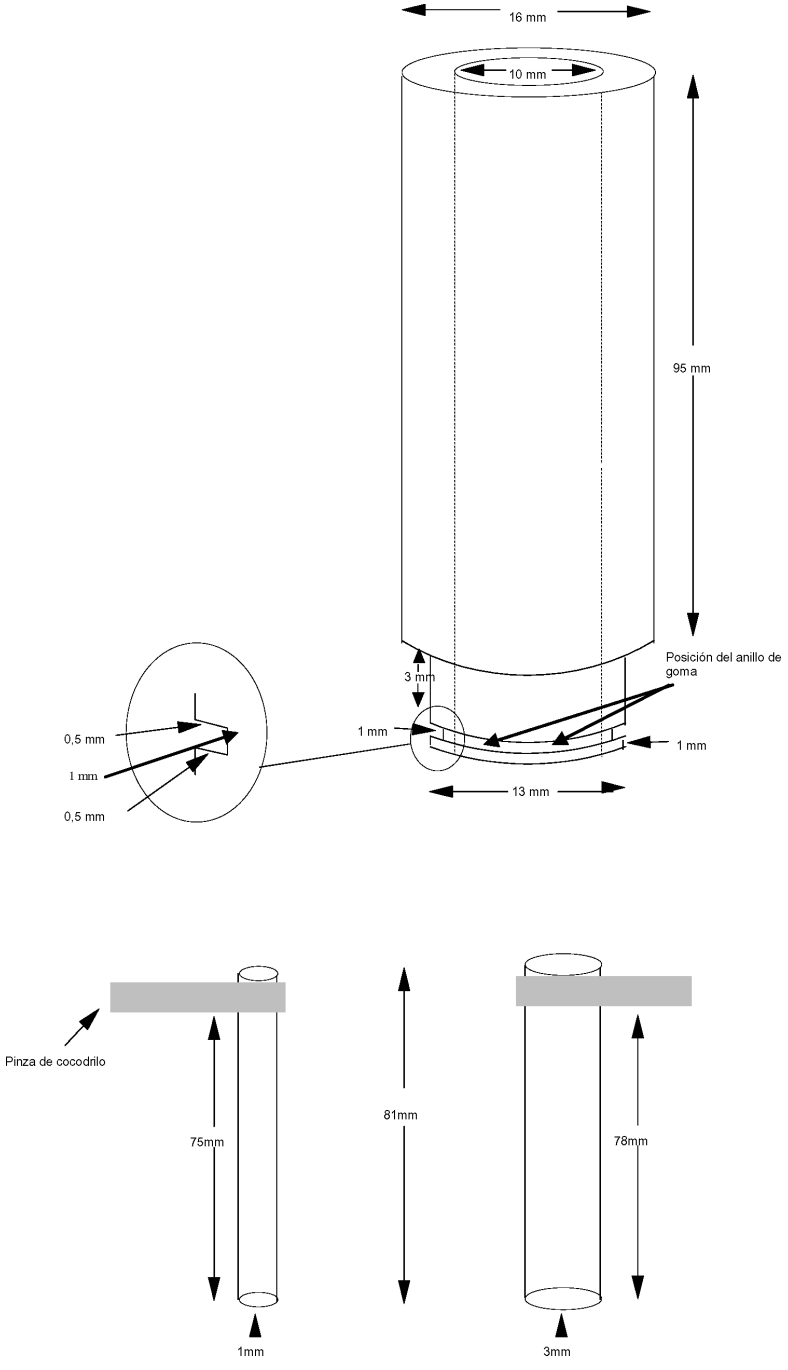
**Instrumental Para El Ensayo De La Ret En Piel De Rata**



▼**M8**

*Figura 2*

**Dimensiones Del Tubo De Politetrafluoretileno (Ptfe), De La Cámara Receptora Y De Los Electrodos Usados**




**Factores críticos del instrumental mostrado arriba:**

— El diámetro interior del tubo de PTFE,

— La longitud de los electrodos respecto al tubo de PTFE y a la cámara receptora, de forma que el disco de piel no toque los electrodos y que haya en contacto con la solución de $MgSO_4$ una longitud fijada de electrodo,

▼**M8**

— La cantidad de solución de $MgSO_4$ presente en la cámara receptora debe hacer que el líquido tenga cierta profundidad respecto al nivel dentro del tubo de PTFE, como se indica en la figura 1,

— El disco de piel debe fijarse bien al tubo de PTFE, de forma que la resistencia eléctrica sea una medida fiel de las propiedades de la piel.

▼M8

*Apéndice*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (20).

**C**: Corrosivo.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Concordancia**: Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo que da un resultado categórico, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «exactitud» se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todos los productos estudiados que se clasifican correctamente como positivos o negativos. La concordancia depende en gran medida de la prevalencia de positivos en los tipos de producto problema que se están examinando (20).

**SGA (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos) de las Naciones Unidas**: Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

**IATA**: Enfoque integrado de pruebas y evaluación (*Integrated Approach to Testing and Assessment*).

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

**Sustancia de un solo componente**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**Sustancia de componentes múltiples**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración $\geq$ 10 % (p/p) y $<$ 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

**NC**: No corrosivo.

**DO**: Densidad óptica.

**TP**: Testigo positivo, réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

▼**M8**

**Normas de comportamiento**: Normas, basadas en un método de referencia validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe presentar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia.

**Pertinencia**: Descripción de la relación del método de ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el método de ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (20).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (20).

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (20).

**Corrosión cutánea *in vitro***: Producción de una lesión irreversible de la piel; en particular, necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, tras la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, sangrado, costras sanguinolentas y, hacia el final del período de observación de catorce días, por decoloración debida al blanqueo de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para evaluar las lesiones dudosas.

**Especificidad**: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (20).

**Sustancia**: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

**Tanda (del ensayo)**: Un solo producto problema sometido a ensayo al mismo tiempo con un mínimo de tres réplicas de discos de piel.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Resistencia eléctrica transcutánea (RET)**: Medida de la impedancia eléctrica de la piel, como valor de la resistencia en kiloohmios. Un método simple y sólido para evaluar la función de barrera consiste en registrar el paso de iones a través de la piel mediante el uso de un puente de Wheatstone.

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos.

▼M8

## B.40*bis*. CORROSIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO CON EPIDERMIS HUMANA RECONSTRUIDA (EHR)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 431 de la OCDE (2016). La corrosión cutánea se refiere a la producción de una lesión irreversible en la piel, que se manifiesta como necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, como consecuencia de la aplicación de un producto problema [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y del Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea ([1])]. El presente método de ensayo B.40 *bis* actualizado establece un procedimiento *in vitro* que permite la identificación de sustancias y mezclas no corrosivas y corrosivas con arreglo al SGA de las Naciones Unidas y al CLP. También permite una subcategorización parcial de los productos corrosivos.

2. La evaluación del potencial de corrosión cutánea de los productos químicos ha supuesto normalmente la utilización de animales de laboratorio (método de ensayo B.4 equivalente a las directrices de ensayo TG 404 de la OCDE); aprobada originalmente en 1981 y revisada en 1992, 2002 y 2015) (2). Además del presente método de ensayo B.40 *bis*, se han validado otros dos métodos de ensayo *in vitro* para detectar el potencial de corrosión de los productos químicos, y se han adoptado como método de ensayo B.40 (equivalente a las directrices de ensayo TG 430 de la OCDE) (3) y método de ensayo B.65 (equivalente a las directrices de ensayo TG 435 de la OCDE) (4). Además, se ha adoptado el método de ensayo *in vitro* B.46 (equivalente a las directrices de ensayo TG 439 de la OCDE) (5) para comprobar el potencial de irritación cutánea. Un documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) describe varios módulos que agrupan diversas fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aporta orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) propone un enfoque cuando se precisan más ensayos (6).

3. El presente método de ensayo se refiere al parámetro de salud humana denominado corrosión cutánea. Este método hace uso de la epidermis humana reconstruida (EHR) (obtenida a partir de queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos) que imita bien las propiedades histológicas, morfológicas, bioquímicas y fisiológicas de las partes superiores de la piel humana, es decir, la epidermis. Las directrices de ensayo correspondientes de la OCDE se adoptaron originalmente en 2004 y se actualizaron en 2013 para incluir métodos de ensayo adicionales que utilizan los modelos de EHR y la posibilidad de utilizar los métodos para apoyar la subcategorización de los productos corrosivos, y se actualizaron de nuevo en 2015 para hacer referencia al documento de orientación sobre los IATA e introducir el uso de un procedimiento alternativo de medición de la viabilidad.

4. En este método de ensayo se incluyen cuatro modelos EHR validados disponibles comercialmente. Se han efectuado estudios de prevalidación (7), seguidos de un estudio formal de validación para evaluar la corrosión cutánea (8) (9) (10) (11) (12), de dos de estos modelos de ensayo disponibles en el mercado, a saber, EpiSkin™ Standard Model (SM) y EpiDerm™ Skin Corrosivity Test (SCT) (EPI-200) (denominados en lo sucesivo «métodos de

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M8

referencia validados», MRV). El resultado de estos estudios llevó a la recomendación de que los dos MRV mencionados podrían utilizarse con fines normativos para distinguir las sustancias corrosivas (C) de las sustancias no corrosivas (NC), y que EpiSkin™ podría utilizarse, además, para apoyar la subcategorización de las sustancias corrosivas (13) (14) (15). Otros dos modelos EHR de ensayo de la corrosión cutánea *in vitro*, disponibles en el mercado, han dado resultados similares al MRV de EpiDerm™ de acuerdo con una validación basada en normas de comportamiento (16) (17) (18). Se trata de SkinEthic™ RHE ([1]) y de epiCS® (anteriormente denominado EST-1000) que también pueden utilizarse con fines normativos para distinguir sustancias corrosivas de sustancias no corrosivas (19) (20). Unos estudios tras la validación, efectuados por los productores del modelo EHR en los años 2012 a 2014 con un protocolo perfeccionado que corrige interferencias de la reducción inespecífica del MTT por los productos problema, mejoraron el comportamiento tanto en cuanto a la discriminación de productos C/NC como en cuanto al apoyo a la subcategorización de los agentes corrosivos (21) (22). Se han llevado a cabo más análisis estadísticos de los datos obtenidos tras la validación con EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE y epiCS®, con el fin de encontrar modelos predictivos alternativos que mejoren la capacidad de asignación para la subcategorización (23).

5. Antes de que pueda utilizarse con fines normativos un método de ensayo EHR *in vitro* similar o modificado para evaluar la corrosión cutánea distinto de los MRV, deben determinarse su fiabilidad, pertinencia (exactitud) y limitaciones para el uso propuesto, a fin de garantizar su similitud con los MRV, de acuerdo con los requisitos de las normas de comportamiento (24) establecidas según los principios del documento de orientación de la OCDE n.º 34 (25). La aceptación mutua de datos solo se garantizará después de que se haya revisado e incluido en las directrices de ensayo correspondientes el eventual método de ensayo nuevo o actualizado propuesto que cumpla las normas de comportamiento. Los modelos de ensayo incluidos en esas directrices de ensayo pueden utilizarse para cumplir los requisitos de los países en cuanto a los resultados de los ensayos sobre el método de ensayo *in vitro* para detectar la corrosión cutánea, al tiempo que se benefician de la aceptación mutua de datos.

DEFINICIONES

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES

7. El presente método de ensayo permite la identificación de sustancias y mezclas no corrosivas y corrosivas con arreglo al SGA de las Naciones Unidas y al CLP. Este método de ensayo facilita, además, la subcategorización de las sustancias y mezclas corrosivas en la subcategoría optativa 1A, de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas (1), así como una combinación de las subcategorías 1B y 1C (21) (22) (23). Una limitación de este método de ensayo es que no permite discriminar entre las subcategorías de corrosivos cutáneos 1B y la 1C, de conformidad con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP, debido a lo limitado del conjunto de grupos de productos corrosivos *in vivo* de la subcategoría 1C. Los modelos de ensayo EpiSkin™, EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE y epiCS® permiten la subcategorización (es decir, 1A frente a 1B-y-1C y frente a NC)

8. En la validación en apoyo de los modelos de ensayo incluidos en el presente método de ensayo, cuando se utilizan para la identificación de agentes no corrosivos y corrosivos, se ha analizado una amplia gama de productos químicos que representan principalmente sustancias individuales; la base de datos empíricos del estudio de validación ascendió a 60 productos que abarcaban una amplia gama de clases químicas (8) (9) (10). Los ensayos

([1]) Se utiliza la abreviatura EHR (= epidermis humana reconstruida) para todos los modelos basados en la tecnología de EHR. La abreviatura inglesa RHE que se utiliza en relación con el modelo de SkinEthic™ significa lo mismo, pero, como parte del nombre de este método de ensayo específico comercializado, se deja en inglés.

▼M8

para demostrar la sensibilidad, la especificidad, la exactitud y la reproducibilidad intralaboratorios del ensayo para la subcategorización fueron realizados por los diseñadores del método de ensayo y sus resultados fueron revisados por la OCDE (21) (22) (23). Sobre la base del conjunto de datos disponibles, el método de ensayo es aplicable a una amplia gama de clases químicas y estados físicos, incluidos líquidos, semisólidos, sólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Siempre que sea posible, los sólidos deben molerse hasta convertirse en polvo fino antes de su aplicación; no se requiere ningún otro tratamiento previo de la muestra. En los casos en que haya pruebas de que los modelos de ensayo incluidos en este método de ensayo no son aplicables a una categoría específica de productos problema, los modelos no deberán utilizarse con tal categoría específica de productos problema. Además, se supone que este método de ensayo es aplicable a las mezclas como una extensión de su aplicabilidad a las sustancias. Sin embargo, debido al hecho de que las mezclas abarcan un amplio espectro de categorías y composiciones, y que actualmente se dispone de información solo limitada sobre los ensayos de mezclas, en los casos en los que pueda demostrarse la inaplicabilidad del método de ensayo a una determinada categoría de mezclas [por ejemplo, a raíz de una estrategia como la propuesta en (26)], el método no deberá utilizarse con tal categoría específica de mezclas. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo. Aún no se han efectuado estudios de validación de gases y aerosoles (8) (9) (10). Aunque no hay que descartar que los gases y aerosoles puedan estudiarse utilizando la tecnología de EHR, el actual método de ensayo no permite hacerlo.

9. Los productos problema que absorben la luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT y los productos problema capaces de reducir directamente el colorante vital MTT (a formazano de MTT) pueden interferir con las mediciones de la viabilidad tisular y hacen necesario el uso de testigos adaptados para efectuar las correcciones oportunas. El tipo de testigos adaptados que puede ser necesario varía en función del tipo de interferencia producida por el producto problema y del procedimiento utilizado para medir el formazano de MTT (véanse los puntos 25-31).

10. Aunque este método de ensayo no proporciona información adecuada sobre la irritación cutánea, cabe señalar que el método de ensayo B.46 aborda específicamente el efecto sanitario de la irritación cutánea *in vitro* (5) y está basado en el mismo sistema de ensayo de EHR, aunque utiliza un protocolo distinto (5). Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una exposición cutánea única, debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (6). Este enfoque IATA incluye la realización de ensayos *in vitro* de corrosión cutánea (como los descritos en el presente método) y de irritación cutánea antes de considerar las pruebas con animales vivos. Se reconoce que el uso de piel humana está sujeto a condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. El producto problema se aplica tópicamente a un modelo de EHR tridimensional, formado por queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos, que se han cultivado para formar un modelo de la epidermis humana bien diferenciado en varias capas. Consiste en las capas basal, espinosa y granulosa organizadas, y en un estrato córneo con varias capas intercelulares laminares de lípidos, que representan las principales clases de lípidos análogas a las que se encuentran *in vivo*.

▼M8

12. El método de ensayo con EHR se basa en la premisa de que los productos corrosivos pueden penetrar en el estrato córneo por difusión o erosión, y son citotóxicos para las células de las capas subyacentes. La viabilidad celular se mide mediante la conversión enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo; número CAS 298-93-1] en una sal de formazano azul que se mide cuantitativamente tras su extracción de los tejidos (27). Los productos corrosivos se identifican por su capacidad de reducir la viabilidad celular por debajo de unos umbrales definidos (véanse los puntos 35 y 36). El método de ensayo de corrosión cutánea basado en la EHR ha demostrado su valor para la asignación de los efectos de corrosión cutánea *in vivo* evaluados en conejos según el método de ensayo B.4 (2).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

13. Antes de proceder al uso sistemático de cualquiera de los cuatro modelos de ensayo EHR validados que se ajustan al presente método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta clasificación de las doce sustancias para la prueba de la competencia recogidas en el cuadro 1. En caso de que se utilice un método de subclasificación, deberá demostrarse que también es correcta la subcategorización. Cuando una sustancia de la lista no esté disponible o en casos justificados, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* [por ejemplo, de la lista de productos de referencia (24)] siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los descritos en el cuadro 1.

*Cuadro 1*

**Lista de sustancias para la prueba de la competencia** (1)

| Sustancia | N.º CAS | Clase química (2) | Cat. según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP sobre la base de resultados *in vivo* (3) | Cat. según los resultados obtenidos con MRV *in vitro* (4) | Reductor de MTT (5) | Estado físico |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Corrosivos *in vivo* de subcategoría 1A | | | | | | |
| Ácido bromoacético | 79-08-3 | Ácido orgánico | 1A | (3) 1A | — | S |
| Trifluoruro de boro dihidratado | 13319-75-0 | Ácido inorgánico | 1A | (3) 1A | — | L |
| Fenol | 108-95-2 | Fenol | 1A | (3) 1A | — | S |
| Cloruro de dicloroacetilo | 79-36-7 | Electrófilo | 1A | (3) 1A | — | L |
| Corrosivos *in vivo* de subcategorías 1B y 1C combinadas | | | | | | |
| Ácido glioxílico monohidratado | 563-96-2 | Ácido orgánico | 1B y 1C | (3) 1B y 1C | — | S |
| Ácido láctico | 598-82-3 | Ácido orgánico | 1B y 1C | (3) 1B y 1C | — | L |
| Etanolamina | 141-43-5 | Base orgánica | 1B | (3) 1B y 1C | Sí | Viscoso |

▼**M8**

| Sustancia | N.º CAS | Clase química ([2]) | Cat. según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP sobre la base de resultados *in vivo* ([3]) | Cat. según los resultados obtenidos con MRV *in vitro* ([4]) | Reductor de MTT ([5]) | Estado físico |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Corrosivos *in vivo* de subcategoría 1A | | | | | | |
| Ácido clorhídrico (14,4 %) | 7647-01-0 | Ácido inorgánico | 1B y 1C | (3) 1B y 1C | — | L |
| No corrosivos *in vivo* | | | | | | |
| Bromuro de fenetilo | 103-63-9 | Electrófilo | NC | (3) NC | Sí | L |
| 4-Amino-1,2,4-triazol | 584-13-4 | Base orgánica | NC | (3) NC | — | S |
| 4-(Metiltio)-benzaldehído | 3446-89-7 | Electrófilo | NC | (3) NC | Sí | L |
| Ácido láurico | 143-07-7 | Ácido orgánico | NC | (3) NC | — | S |

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; MRV = método de referencia validado; NC = no corrosivo; S = sólido; L = líquido.

([1]) Las sustancias para la prueba de la competencia, clasificadas primero entre corrosivas y no corrosivas, y después por su clase química, se seleccionaron de entre las sustancias utilizadas en los estudios de validación del ECVAM de EpiSkin™ y EpiDerm™ (8) (9) (10) y de los estudios tras la validación sobre la base de los datos proporcionados por los diseñadores de EpiSkin™ (22), EpiDerm™, SkinEthic™ y epiCS® (23). Salvo que se indique lo contrario, las sustancias se sometieron a prueba al nivel de pureza obtenido cuando se compran de una fuente comercial (8) (10). En la selección se incluyen, en la medida de lo posible, sustancias que: i) son representativas de la gama de respuestas de corrosividad (p. ej., sustancias no corrosivas; sustancias débilmente corrosivas a fuertemente corrosivas) que los MRV pueden medir o predecir; ii) son representativas de las clases químicas utilizadas en los estudios de validación; iii) tienen estructuras químicas bien definidas; iv) inducen resultados reproducibles en los MVR; v) inducen resultados definitivos con el método de ensayo de referencia *in vivo*; vi) están disponibles en el comercio; y vii) no tienen asociados costes de eliminación prohibitivos.

([2]) Clase química asignada por Barratt *et al.* (8).

([3]) Los grupos de embalaje de las Naciones Unidas correspondientes son I, II y III, respectivamente, respecto a las categorías 1A, 1B y 1C del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

([4]) Las asignaciones *in vitro* obtenidas con los MRV y presentadas en este cuadro se obtuvieron con los modelos de ensayo EpiSkin™ y EpiDerm™ (MRV) durante pruebas realizadas tras la validación por los diseñadores del método de ensayo.

([5]) Los valores de viabilidad obtenidos en los estudios de validación de la corrosión cutánea del ECVAM no se corrigieron para tener en cuenta la reducción directa del MTT (en los estudios de validación no se hicieron controles con tejidos muertos). Sin embargo, los datos tras la validación generados por los diseñadores del método de ensayo que se presentan en este cuadro se obtuvieron con controles adaptados (23).

14. Como parte del ejercicio de demostración de la competencia, se recomienda que el usuario verifique las propiedades de barrera de los tejidos tras su recepción, siguiendo las especificaciones del fabricante del modelo de EHR. Este aspecto es particularmente importante si el envío de los tejidos implica grandes distancias o largos plazos. Una vez se haya establecido con éxito un método de ensayo y se haya demostrado la competencia para su uso, no será necesario efectuar esta verificación de forma sistemática. Sin embargo, cuando se utilice sistemáticamente un método de ensayo, se recomienda seguir evaluando las propiedades de barrera a intervalos periódicos.

PROCEDIMIENTO

15. A continuación se describen de forma genérica los componentes y procedimientos de los modelos de ensayo de EHR para la evaluación de la corrosión cutánea objeto del presente método de ensayo. Los modelos de EHR aprobados para usarse en este método de ensayo, es decir, los modelos EpiSkin™ (SM), EpiDerm™ (EPI-200), SkinEthic™ RHE y epiCS® (16) (17) (19) (28) (29) (30) (31) (32) (33), pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales. Los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) de estos cuatro modelos de EHR están disponibles (34) (35) (36) (37), y los principales componentes de su método de ensayo se resumen en el apéndice 2. Se recomienda consultar el PNT correspondiente a la hora de aplicar y utilizar

▼M8

uno de estos modelos en el laboratorio. El ensayo con los cuatro modelos de ensayo EHR que corresponden al presente método de ensayo debe cumplir las condiciones siguientes:

COMPONENTES DEL MÉTODO DE ENSAYO EHR

**Condiciones generales**

16. Para reconstruir el epitelio deben utilizarse queratinocitos humanos no transformados. Bajo un estrato córneo funcional, deben encontrarse varias capas de células epiteliales viables (estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso). El estrato córneo debe constar de varias capas con el perfil lipídico necesario para constituir una barrera funcional con la suficiente resistencia contra la penetración rápida de los productos citotóxicos de referencia como, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (DSS) o tritón X-100. La existencia de la función de barrera debe demostrarse, y puede evaluarse determinando la concentración a la que el producto de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % ($CI_{50}$) tras un tiempo fijo de exposición, o bien determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % ($TE_{50}$) tras la aplicación del producto de referencia a una concentración fija especificada (véase el punto18). Las propiedades de aislamiento del modelo de EHR deben evitar que pase material del estrato córneo al tejido viable, lo que reduciría la calidad del modelo en cuanto a la exposición de la piel. El modelo de EHR debe estar exento de contaminación por bacterias, virus, micoplasmas u hongos.

**Condiciones funcionales**

*Viabilidad*

17. El ensayo utilizado para cuantificar la viabilidad tisular es el ensayo de MTT (27). Las células viables de la construcción tisular de EHR reducen el colorante vital MTT a un precipitado azul de formazano de MTT, que se extrae del tejido utilizando isopropanol (o un disolvente similar). La densidad óptica (DO) del disolvente de extracción solo debe ser suficientemente baja, es decir, DO < 0,1. El formazano de MTT extraído puede cuantificarse utilizando una medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (38). Los usuarios del modelo de EHR deben asegurarse de que cada lote utilizado de este modelo cumple los criterios definidos en relación con el testigo negativo. El diseñador o proveedor del modelo de EHR debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límite superior e inferior) de los valores de DO de los testigos negativos. En el cuadro 2 figuran los intervalos de aceptabilidad de los valores de DO de los testigos negativos correspondientes a los cuatro modelos de ensayo de EHR validados que se incluyen en el presente método de ensayo. Como criterio de aceptación del testigo negativo, los usuarios de la espectrofotometría con HPLC/UPLC deben utilizar las bandas de DO del testigo negativo que figuran en el cuadro 2. Hay que demostrar documentalmente que los tejidos tratados con el testigo negativo son estables en cultivo (proporcionan unas mediciones similares de la DO) durante todo el tiempo de exposición.

*Cuadro 2*

**Intervalos de aceptabilidad de los valores de DO del testigo negativo para controlar la calidad del lote**

| | Límite inferior de aceptación | Límite superior de aceptación |
|---|---|---|
| EpiSkin™ (SM) | > 0,6 | < 1,5 |
| EpiDerm™ SCT (EPI-200) | > 0,8 | < 2,8 |
| SkinEthic™ RHE | > 0,8 | < 3,0 |
| epiCS® | > 0,8 | < 2,8 |

▼M8

*Función de barrera*

18. El estrato córneo y su composición lipídica deben ser suficientes para impedir la penetración rápida de determinados productos citotóxicos de referencia (por ejemplo, DSS o tritón X-100), evaluada mediante la $CI_{50}$ o el $TE_{50}$ (véase el cuadro 3). La función de barrera de cada modelo de EHR utilizado debe estar demostrada por el diseñador o vendedor del modelo de EHR en el momento del suministro de los tejidos al usuario final (véase el punto 21).

*Morfología*

19. Debe realizarse un examen histológico del modelo de EHR que demuestre una estructura de varias capas similar a la epidermis humana, con estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo, y con un perfil lipídico similar al perfil lipídico de la epidermis humana. El diseñador o vendedor del modelo de EHR debe aportar, en el momento del suministro de los tejidos al usuario final, un examen histológico de cada lote del modelo de EHR utilizado en el que se demuestre la morfología adecuada de los tejidos (véase el punto 21).

*Reproducibilidad*

20. Los usuarios del método de ensayo deben demostrar la reproducibilidad de este a lo largo del tiempo con testigos positivos y negativos. Además, el método de ensayo solo debe utilizarse si el diseñador o proveedor del modelo de EHR proporciona datos que demuestran la reproducibilidad a lo largo del tiempo con productos corrosivos y no corrosivos de, por ejemplo, la lista de sustancias para la prueba de la competencia (cuadro 1). En caso de que se utilice un método de ensayo para la subcategorización, también debe demostrarse la reproducibilidad respecto a esta.

*Control de calidad (CC)*

21. El modelo de EHR solo debe utilizarse si el diseñador o proveedor demuestra que cada lote del modelo utilizado cumple los criterios definidos de aprobación de la producción, los más importantes de los cuales son los relativos a la viabilidad (punto 17), a la función de barrera (punto 18) y a la morfología (punto 19). Estos datos deben proporcionarse a los usuarios del método de ensayo, de manera que puedan incluirlos en el informe del ensayo. Para conseguir una asignación fiable de la clasificación en cuanto al efecto corrosivo, solo pueden aceptarse los resultados obtenidos con lotes de tejidos aprobados en el CC. El diseñador o proveedor del modelo de EHR debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límite superior e inferior) de los valores de $CI_{50}$ o $TE_{50}$. En el cuadro 3 figuran los intervalos de aceptabilidad de los cuatro modelos de ensayo validados.

*Cuadro 3*

**Criterios de control de calidad para la aprobación de los lotes**

| | Límite inferior de aceptación | Límite superior de aceptación |
|---|---|---|
| EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamiento con DSS) (33). | $CI_{50}$ = 1,0 mg/ml | $CI_{50}$ = 3,0 mg/ml |
| EpiDerm™ SCT (EPI-200) (Tritón X-100 al 1 %) (34) | $TE_{50}$ = 4,0 horas | $TE_{50}$ = 8,7 horas |
| SkinEthic™ RHE (Tritón X-100 al 1 %) (35) | $TE_{50}$ = 4,0 horas | $TE_{50}$ = 10,0 horas |
| epiCS® (Tritón X-100 al 1 %) (36) | $TE_{50}$ = 2,0 horas | $TE_{50}$ = 7,0 horas |

▼M8

**Aplicación de los productos problema y testigo**

22. Deben utilizarse al menos dos réplicas tisulares con cada producto problema y testigos con cada tiempo de exposición. En caso de productos líquidos, así como sólidos, debe aplicarse una cantidad de producto problema suficiente para cubrir uniformemente la superficie de la epidermis pero evitando una dosis excesiva, es decir, un mínimo de 70 µl/cm$^2$ o 30 mg/cm$^2$. Según los modelos, antes de aplicar productos sólidos debe humedecerse la superficie de la epidermis con agua desionizada o destilada, para mejorar el contacto de dicha superficie con el producto problema (34) (35) (36) (37). Siempre que sea posible, los sólidos deben someterse a ensayo en forma de polvo fino. El método de aplicación debe ser adecuado para el producto problema (véanse, por ejemplo, las referencias 34-37). Al final del período de exposición, el producto problema debe retirarse cuidadosamente dela epidermis lavando con una solución amortiguadora acuosa o una solución de NaCl al 0,9 %. Dependiendo de cuál de los cuatro modelos de ensayo de EHR se utilice, se utilizarán dos o tres períodos de exposición por producto problema (para los cuatro modelos de EHR válidos: 3 min y 1 hora; en el caso de EpiSkin™, un tiempo de exposición adicional de 4 horas). En función del modelo de ensayo de EHR utilizado y del período de exposición evaluado, la temperatura de incubación durante la exposición puede variar entre la temperatura ambiente y 37 °C.

23. Deben utilizarse en cada tanda testigos negativos y positivos (TP) en paralelo para demostrar que la viabilidad (con los testigos negativos), la función de barrera y la sensibilidad tisular resultante (con los TP) de los tejidos se encuentran dentro de una banda de aceptación histórica definida. Según el modelo de EHR utilizado, los productos TP que se proponen son ácido acético glacial o KOH 8 N. Cabe señalar que la KOH 8 N es un reductor directo del MTT que puede requerir controles adaptados, tal como se describe en los puntos 25 y 26. Las sustancias testigo negativo que se proponen son NaCl al 0,9 % o agua.

**Medición de la viabilidad celular**

24. El ensayo del MTT, que es un ensayo cuantitativo, debe utilizarse para medir la viabilidad celular según el presente método de ensayo (27). La muestra de tejido se coloca en una solución de MTT de la concentración adecuada (0,3 o 1 mg/ml) durante 3 horas. A continuación, el producto de formazano azul precipitado se extrae del tejido utilizando un disolvente (p. ej., isopropanol, isopropanol ácido), y la concentración de formazano se mide determinando la DO a 570 nm con un paso de banda máximo de ± 30 nm, o mediante un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (véanse los puntos 30 y 31) (38).

25. Ciertos productos problema pueden interferir con el ensayo del MTT, mediante una reducción directa del MTT a formazano azul, y/o mediante interferencia de color si el producto problema absorbe, de forma natural o debido a los procedimientos del tratamiento, en la misma gama de DO que el formazano (570 ± 30 nm, principalmente productos químicos de color azul y violeta). Deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir una posible interferencia con estos productos problema, como el control de reducción inespecífica del MTT (NSMTT) y el control del color inespecífico (NSC) (véanse los puntos 26 a 30). Esto es especialmente importante cuando un producto problema específico no se elimina completamente del tejido por el lavado o cuando penetra en la epidermis, y está presente, por tanto, en los tejidos cuando se realiza la prueba de viabilidad del MTT. En los PNT correspondientes a los modelos de ensayo puede encontrarse una descripción pormenorizada de la forma de corregir la reducción directa del MTT y las interferencias debidas a agentes colorantes (34) (35) (36) (37).

▼**M8**

26. Para identificar los reductores directos del MTT, cada producto problema debe añadirse a un medio de MTT recién preparado (34) (35) (36) (37). Si la mezcla de MTT que contiene el producto problema se pone azul/violeta, se supone que el producto problema reduce directamente el MTT y debe efectuarse otro control funcional con epidermis inviable, con independencia de que se utilice la medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC. Este control funcional adicional emplea tejidos muertos que solo poseen actividad metabólica residual, pero que absorben el producto problema en cantidad similar a los tejidos viables. Cada producto que reduce el MTT se aplica en al menos dos réplicas de tejido muerto por cada tiempo de exposición, que se someten al ensayo completo de corrosión cutánea. La viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos sometidos al reductor del MTT menos el porcentaje de reducción inespecífica del MTT obtenido con los tejidos muertos expuestos al mismo reductor del MTT, calculados en relación con el testigo negativo aplicado en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSMTT).

27. Para detectar la posible interferencia debida a productos problema coloreados o que se colorean cuando se ponen en contacto con el agua o el isopropanol y decidir sobre si es necesario efectuar más controles, debe llevarse a cabo un análisis espectral del producto problema en agua (entorno durante la exposición) y/o en isopropanol (solución de extracción). Si el producto problema en agua o isopropanol absorbe luz en el intervalo de 570 ± 30 nm, deben llevarse a cabo otros controles del colorante o, como alternativa, debe utilizarse un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC, en cuyo caso estos controles no son necesarios (véanse los puntos 30 y 31). Cuando se realiza la medición normal de la absorbancia (DO), cada producto problema coloreado que interfiere se aplica en al menos dos réplicas de tejido viable por tiempo de exposición, que se someten al ensayo completo de corrosión cutánea, pero se incuban con medio en lugar de con una soluciónde MTT durante la fase de incubación del MTT para generar un control de color inespecífico ($NSC_{vivo}$). El control $NSC_{vivo}$ debe realizarse en paralelo en cada tiempo de exposición y con cada producto problema coloreado (en cada tanda) debido a la variabilidad biológica inherente de los tejidos vivos. A continuación, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con una solución de MTT menos el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, efectuado todo al mismo tiempo que el ensayo que se está corrigiendo(% $NSC_{vivo}$).

28. Los productos problema que se identifican como causantes tanto de reducción directa del MTT (véase el punto 26) como de interferencia de color (véase el punto 27) también requerirán un tercer conjunto de controles, aparte de los controles NSMTT y $NSC_{vivo}$ que se describen en los puntos anteriores, cuando se lleva a cabo la medición normal de la absorbancia (DO). Esto es generalmente así en el caso de los productos problema de color oscuro que interfieren con el ensayo del MTT (p. ej., azul, violeta, negro) porque su color intrínseco impide la evaluación de su capacidad para reducir directamente el MTT, tal como se describe en el punto 26. Estos productos problema pueden unirse tanto a los tejidos vivos como a los muertos y, por tanto, el control NSMTT puede facilitar la corrección no solo de la posible reducción directa del MTT por el producto problema, sino también de la interferencia de color derivada de la unión del producto problema a los tejidos muertos. Esto podría dar lugar a una doble corrección por la interferencia de color, puesto que el $NSC_{vivo}$ ya corrige la interferencia de color derivada de la unión del producto problema a los tejidos vivos. Para evitar una posible doble corrección por la interferencia de color, es necesario realizar un tercer control del color inespecífico con tejidos muertos ($NSC_{muerto}$). En este testigo adicional, el producto problema se aplica en al menos dos réplicas de tejido muerto por cada tiempo de exposición, que se someten a todo el procedimiento de ensayo, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT. Un solo testigo de $NSC_{muerto}$ es suficiente por

▼**M8**

producto problema cualquiera que sea el número de ensayos o tandas independientes realizados, pero debe aplicarse al mismo tiempo que el control de NSMTT y, en la medida de lo posible, con el mismo lote de tejidos. A continuación, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema menos el % NSMTT menos el % $NSC_{vivo}$ más el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos muertos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, calculado en relación con el control negativo que se lleva a cabo en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% $NSC_{muerto}$).

29. Es importante señalar que las interferencias de reducción inespecífica del MTT y de color inespecífico pueden aumentar las lecturas del extracto tisular por encima del intervalo de linealidad del espectrofotómetro. Sobre esta base, cada laboratorio debe determinar el intervalo de linealidad de su espectrofotómetro con formazano de MTT (n.º CAS 57360-69-7) procedente de una fuente comercial antes de iniciar el ensayo de los productos problema con fines normativos. En particular, la medición normal de la absorbancia (DO) mediante el uso de un espectrofotómetro es adecuada para evaluar los productos problema que son reductores directos del MTT y los que interfieren con el color, cuando las DO de los extractos tisulares obtenidas con el producto problema sin ninguna corrección por la reducción directa del MTT o la interferencia de color se encuentran dentro del intervalo lineal del espectrofotómetro o cuando la viabilidad porcentual sin corregir obtenida con el producto problema ya lo ha definido como corrosivo (véanse los puntos 35 y 36). No obstante, deben tomarse con precaución los resultados de los productos problema que muestran un % NSMTT o un % $NSC_{vivo}$ > 50 % del testigo negativo.

30. En el caso de los productos problema coloreados que no son compatibles con la medición normal de la absorbancia (DO) debido a una interferencia demasiado fuerte con el ensayo del MTT, puede emplearse el procedimiento alternativo de espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT (véase el punto 31) (37). El sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC permite separar el formazano de MTT del producto problema antes de su cuantificación (38). Por esta razón, los controles $NSC_{vivo}$ o $NSC_{muerto}$ no son necesarios nunca si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, independientemente del producto sometido a ensayo. No obstante, deben utilizarse los controles NSMTT si se sospecha que el producto problema reduce directamente el MTT o tiene un color que obstaculiza la evaluación de la capacidad de reducir directamente el MTT (tal como se describe en el punto 26). Cuando se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. En el caso de los productos problema capaces de reducir directamente el MTT, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de la viabilidad tisular obtenida con los tejidos vivos expuestos al producto problema menos el porcentaje de NSMTT.Por último, hay que señalar que no pueden evaluarse los reductores directos de MTT que también pueden interferir con el color, que se mantienen en los tejidos después del tratamiento y reducen el MTT de manera tan intensa que llevan a unas DO (con medición normal de la DO) o a unas áreas bajo el pico (con espectrofotometría con UPLC/HPLC) de los extractos tisulares analizados que quedan fuera del intervalo de linealidad del espectrofotómetro, aunque se espera que estos casos se produzcan solo en muy raras situaciones.

▼M8

31. La espectrofotometría con HPLC/UPLC puede utilizarse también para medir el formazano de MTT con todos los tipos de productos problema (con color, sin color, reductores del MTT, no reductores del MTT) (38). Debido a la diversidad de sistemas de espectrofotometría con HPLC/UPLC, antes de utilizar uno de estos sistemas para cuantificar el formazano de MTT en extractos tisulares, ha de demostrarse que es apto a tal fin mediante el cumplimiento de los criterios de aceptación respecto a un conjunto de parámetros normales de aptitud sobre la base de los descritos en el documento de orientación de la Food and Drug Administration de EE. UU. para la industria sobre la validación de métodos bioanalíticos (38) (39). Estos parámetros clave y sus criterios de aceptación figuran en el apéndice 4. Una vez se hayan cumplido los criterios de aceptación definidos en el apéndice 4, se considera que el sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC es apto y está listo para medir el formazano de MTT en las condiciones experimentales descritas en el presente método de ensayo.

**Criterios de aceptabilidad**

32. Con cada método de ensayo que utilice modelos de EHR válidos, los tejidos tratados con el testigo negativo deben presentar una DO que refleje la calidad de los tejidos, tal como se describe en el cuadro 2, y no deben estar por debajo de los límites establecidos según los datos históricos. Los tejidos tratados con el TP, a saber, ácido acético glacial o KOH 8 N, deben reflejar la capacidad de los tejidos de responder a un producto corrosivo en las condiciones del modelo de ensayo (véase el apéndice 2). La variabilidad entre las réplicas tisulares de los productos problema y/o productos testigo debe estar dentro de los límites aceptados en relación con los requisitos de cada modelo de EHR válido (véase el apéndice 2) (p. ej., la diferencia de viabilidad entre las dos réplicas tisulares no debe superar el 30 %). Si el testigo negativo o el TP incluido en una tanda queda fuera de los intervalos aceptados, se considera que la tanda no es apta y debe repetirse. Si la variabilidad de los productos problema está fuera del intervalo definido, deben repetirse sus ensayos.

**Interpretación de los resultados y modelo de asignación**

33. Los valores de DO obtenidos con cada producto problema deben utilizarse para calcular el porcentaje de viabilidad respecto al testigo negativo, que se fija arbitrariamente en el 100 %. Si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. El porcentaje umbral de viabilidad celular que permite distinguir los productos problema corrosivos de los no corrosivos (o discriminar entre distintas subcategorías de corrosivos) se define en los puntos 35 y 36 para cada uno de los modelos de ensayo cubiertos por el presente método de ensayo y debe utilizarse para interpretar los resultados.

34. Una sola tanda de ensayos, formada al menos por dos réplicas tisulares, debería ser suficiente para un producto problema, si la clasificación resultante es clara. Sin embargo, en caso de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas, debería plantearse la conveniencia de efectuar una segunda tanda, así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras.

35. En el cuadro 4 se recoge el modelo de asignación del modelo de ensayo de corrosión cutánea EpiSkin™ (9) (34) (22), asociado al sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

▼M8

*Cuadro 4*

**Modelo de asignación EpiSkin™**

| Viabilidad medida tras los tiempos de exposición (t = 3, 60 y 240 minutos) | Asignación que debe considerarse |
|---|---|
| < 35 % tras 3 min de exposición | **Corrosivo:**<br>• Subcategoría optativa 1A (*) |
| > 35 % tras 3 min de exposición **Y**<br>< 35 % tras 60 min de exposición<br>**O**<br>≥ 35 % tras 60 min de exposición **Y**<br>< 35 % tras 240 min de exposición | **Corrosivo:**<br>• Combinación de las subcategorías optativas 1B y 1C |
| ≥ 35 % tras 240 min de exposición | **No corrosivo** |

(*) Según los datos obtenidos con el fin de evaluar la utilidad de los modelos de ensayo de EHR para apoyar la subcategorización, se ha demostrado que en torno al 22 % de los resultados de la subcategoría 1A del modelo de ensayo EpiSkin™ pueden corresponder en realidad a sustancias/mezclas de subcategoría 1B o subcategoría 1C (es decir, sobreclasificaciones) (véase el apéndice 3).

36. En el cuadro 5 se muestran los modelos de asignación de los modelos de ensayo de corrosión cutánea EpiDerm™ SCT (10) (23) (35), SkinEthic™ RHE (17) (18) (23) (36), y epiCS® (16) (23) (37), asociados al sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas y el CLP.

*Cuadro 5*

**EpiDerm™ SCT, SkinEthic™ RHE y epiCS®**

| Viabilidad medida tras los tiempos de exposición (t = 3, y 60 minutos) | Asignación que debe considerarse |
|---|---|
| ETAPA 1 con EpiDerm™ SCT, con SkinEthic™ RHE y epiCS® | |
| < 50 % tras 3 min de exposición | **Corrosivo** |
| ≥ 50 % tras 3 min de exposición **Y**<br>< 15 % tras 60 min de exposición | **Corrosivo** |
| ≥ 50 % tras 3 min de exposición **Y**<br>≥ 15 % tras 60 min de exposición | **No corrosivo** |
| ETAPA 2 con EpiDerm™ SCT, en caso de sustancias o mezclas identificadas como corrosivas en la etapa 1 | |
| < 25 % tras 3 min de exposición | Subcategoría optativa 1A* |
| ≥ 25 % tras 3 min de exposición | Combinación de las subcategorías optativas 1B y 1C |
| ETAPA 2 con SkinEthic™ RHE, en caso de sustancias o mezclas identificadas como corrosivas en la etapa 1 | |
| < 18 % tras 3 min de exposición | Subcategoría optativa 1A* |

▼M8

| Viabilidad medida tras los tiempos de exposición (t = 3, y 60 minutos) | Asignación que debe considerarse |
|---|---|
| ETAPA 1 con EpiDerm™ SCT, con SkinEthic™ RHE y epiCS® | |
| ≥ 18 % tras 3 min de exposición | Combinación de las subcategorías optativas 1B y 1C |
| ETAPA 2 con epiCS®, en caso de sustancias o mezclas identificadas como corrosivas en la etapa 1 | |
| < 15 % tras 3 min de exposición | Subcategoría optativa 1A* |
| ≥ 15 % tras 3 min de exposición | Combinación de las subcategorías optativas 1B y 1C |

DATOS E INFORME

**Datos**

37. Respecto a cada ensayo, deben recogerse en un cuadro los datos obtenidos con las distintas réplicas tisulares (p. ej., los valores de DO y los porcentajes de viabilidad celular calculados para cada producto problema, con la clasificación), incluidos los datos de los experimentos repetidos, en su caso. Además, deben comunicarse las medias e intervalos de viabilidad y coeficientes de variación entre las réplicas tisulares de cada ensayo. Con respecto a cada producto estudiado, deben indicarse las interacciones observadas con el reactivo MTT por tratarse de productos reductores directos del MTT o estar coloreados.

**Informe del ensayo**

38. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Productos problema y testigo:*

— Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;

— Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— Origen; número de lote, si está disponible;

— Tratamiento del producto problema / sustancia testigo antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha para nuevo análisis, si se conoce;

— Condiciones de conservación.

*Modelo de EHR y protocolo utilizados y justificación (si procede)*

*Condiciones de ensayo:*

— Modelo de EHR utilizado (incluido el número de lote);

▼**M8**

— Información sobre la calibración del dispositivo de medición (por ejemplo, espectrofotómetro), la longitud de onda y el paso de banda (si procede) utilizados para cuantificar el formazano de MTT y el intervalo de linealidad del dispositivo de medición;

— Descripción del método utilizado para cuantificar el MTT de formazano;

— Descripción de la aptitud del sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC, si procede;

— Información justificativa completa sobre el modelo de EHR concreto utilizado, incluido su comportamiento. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:

  i) Viabilidad;

  ii) Función de barrera;

  iii) Morfología;

  iv) Reproducibilidad y capacidad de asignación;

  v) Controles de calidad (CC) del modelo;

— Referencia a datos históricos del modelo; aquí debe incluirse, entre otras cosas, la aceptabilidad de los datos de control de calidad con referencia a datos de lotes anteriores;

— Demostración de la competencia para la realización del método de ensayo antes de su uso sistemático mediante ensayo de las sustancias para la prueba de la competencia.

*Procedimiento de ensayo:*

— Detalles del procedimiento de ensayo utilizado (incluidos los procedimientos de lavado utilizados tras el período de exposición);

— Dosis del producto problema y de los productos testigo utilizados;

— Duración del período o períodos de exposición y temperatura o temperaturas de exposición;

— Indicación de los controles utilizados con productos problema que son reductores directos del MTT y/o colorantes, en su caso;

— Número de réplicas tisulares utilizadas con cada producto problema y testigo (TP, testigo negativo, NSMTT, $NSC_{vivo}$ y $NSC_{muerto}$, en su caso) por tiempo de exposición;

— Descripción de los criterios de decisión / modelo de asignación aplicados sobre la base del modelo de EHR utilizado;

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo (incluidos los procedimientos de lavado).

*Criterios de aceptación de las tandas y del ensayo:*

— Valores medios e intervalos de aceptación de los testigos positivos y negativos a partir de datos históricos;

— Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares con respecto a los testigos positivos y negativos;

▼**M8**

— Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares correspondientes a cada producto problema.

*Resultados:*

— Cuadros de datos de las mediciones con cada producto problema y testigo, cada período de exposición, cada tanda y cada réplica, incluidas la DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular, el porcentaje medio de viabilidad tisular, las diferencias entre las réplicas, las desviaciones típicas y/o los coeficientes de variación, si procede;

— En su caso, los resultados de los controles utilizados en relación con los productos problema que son reductores directos del MTT o colorantes, incluida la DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el % NSMTT, el % $NSC_{vivo}$, el % $NSC_{muerto}$, diferencias en las réplicas tisulares, desviaciones típicas o coeficientes de variación (en su caso) y porcentaje final correcto de viabilidad tisular;

— Resultados obtenidos con el producto o productos problema y productos testigo en relación con los criterios definidos de aceptación de las tandas y del ensayo;

— Descripción de otros efectos observados;

— Clasificación derivada con referencia al modelo de asignación o a los criterios de decisión utilizados.

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA) Quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html

(2) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.

(3) Capítulo B.40 del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*:

(4) Capítulo B.65 del presente anexo, Método de ensayo con barrera de membrana *in vitro*.

(5) Capítulo B.46 del presente anexo, Irritación cutánea *in vitro*: Método de ensayo con epidermis humana reconstruida.

(6) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203) Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(7) Botham P.A., Chamberlain M., Barratt M.D., Curren R.D., Esdaile D.J., Gardner J.R., Gordon V.C., Hildebrand B., Lewis R.W., Liebsch M., Logemann P., Osborne R., Ponec M., Regnier J.F., Steiling W., Walker A.P., and Balls M. (1995). A Prevalidation Study on *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. The report and Recommendations of ECVAM Workshop *6.ATLA* 23:219-255.

(8) Barratt M.D., Brantom P.G., Fentem J.H., Gerner I., Walker A.P., and Worth A.P. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 1. Selection and distribution of the Test Chemicals. *Toxicol.In Vitro* 12:471-482.

▼**M8**

(9) Fentem J.H., Archer G.E.B., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdaile D.J., Holzhutter H.-G., and Liebsch M. (1998). The EC-VAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for SkinCorrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicol.in Vitro 12:483-524.

(10) Liebsch M., Traue D., Barrabas C., Spielmann H., Uphill, P., Wilkins S., Wiemann C., Kaufmann T., Remmele M. and Holzhütter H. G. (2000). The ECVAM Prevalidation Study on the Use of EpiDerm for Skin Corrosivity Testing, *ATLA* 28: 371-401.

(11) Balls M., Blaauboer B.J., Fentem J.H., Bruner L., Combes R.D., Ekwall B., Fielder R.J., Guillouzo A., Lewis R.W., Lovell D.P., Reinhardt C.A., Repetto G., Sladowski D., Spielmann H. et Zucco F. (1995). Practical Aspects of the Validation of Toxicity Test Procedures. The Report and Recommendations of ECVAM Workshops, ATLA 23:129-147.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological TestMethods. NIH Publication No 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(13) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™ (EPI-200), EPISKIN™ (SM), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) Assay: *In Vitro* Test Methods for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. NIH Publication No 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA.

(14) EC-ECVAM (CEVMA de la CE) (1998). Statement on the Scientific Validity of the EpiSkin™ Test (an *In Vitro* Test for Skin Corrosivity), Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC10), 3 April 1998.

(15) EC-ECVAM (CEVMA de la CE) (2000). Statement on the Application of the EpiDerm™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC14), 21 March 2000.

(16) Hoffmann J., Heisler E., Karpinski S., Losse J., Thomas D., Siefken W., Ahr H.J., Vohr H.W. and Fuchs H.W. (2005). Epidermal-Skin-Test 1000 (EST-1000)-A New Reconstructed Epidermis for *In Vitro* Skin Corrosivity Testing. *Toxicol.In Vitro* 19: 925-929.

(17) Kandárová H., Liebsch M., Spielmann,H., Genschow E., Schmidt E., Traue D., Guest R., Whittingham A., Warren N, Gamer A.O., Remmele M., Kaufmann T., Wittmer E., De Wever B., and Rosdy M. (2006). Assessment of the Human Epidermis Model SkinEthic RHE for *In Vitro* Skin Corrosion Testing of Chemicals According to New OECD TG 431. *Toxicol.In Vitro* 20: 547-559.

(18) Tornier C., Roquet M. and Fraissinette A.B. (2010). Adaptation of the Validated SkinEthic™ Reconstructed Human Epidermis (RHE) Skin Corrosion Test Method to 0,5 $cm^2$ Tissue Sample. *Toxicol. In Vitro* 24: 1379-1385.

(19) EC-ECVAM (CEVMA de la CE) (2006). Statement on the Application of the SkinEthic™ Human Skin Model for Skin Corrosivity Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC25), 17 November 2006.

(20) EC-ECVAM (CEVMA de la CE) (2009). ESAC Statement on the Scientific Validity of an *In-Vitro* Test Method for Skin Corrosivity Testing: the EST-1000, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 12 June 2009.

▼**M8**

(21) OCDE (2013). Summary Document on the Statistical Performance of Methods in OECD Test Guideline 431 for Sub-categorisation. Environment, Health, and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 190). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(22) Alépée N., Grandidier M.H., and Cotovio J. (2014). Sub-Categorisation of Skin Corrosive Chemicals by the EpiSkin™ Reconstructed Human Epidermis Skin Corrosion Test Method According to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431. *Toxicol. In Vitro* 28:131-145.

(23) Desprez B., Barroso J., Griesinger C., Kandárová H., Alépée N., and Fuchs, H. (2015). Two Novel Prediction Models Improve Predictions of Skin Corrosive Sub-categories by Test Methods of OECD Test Guideline No 431. *Toxicol. In Vitro* 29:2055-2080.

(24) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Epidermis (RHE) Test Methods For Skin Corrosion in Relation to OECD TG 431. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 219). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(25) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(26) Eskes C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data Within the European Framework: Workshop Recommendations. *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 62:393-403.

(27) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.

(28) Tinois E., *et al.* (1994). The Episkin Model: Successful Reconstruction of Human *Epidermis In Vitro.* In: *In Vitro* Skin Toxicology. Rougier A.,. Goldberg A.M and Maibach H.I. (Eds): 133-140.

(29) Cannon C. L., Neal P.J., Southee J.A., Kubilus J. and Klausner M. (1994), New Epidermal Model for Dermal Irritancy Testing. *Toxicol.in Vitro* 8:889 - 891.

(30) Ponec M., Boelsma E, Weerheim A, Mulder A, Bouwstra J and Mommaas M. (2000). Lipid and Ultrastructural Characterization of Reconstructed Skin Models. Inter. J. Pharmaceu. 203:211 - 225.

(31) Tinois E., Tillier, J., Gaucherand, M., Dumas, H., Tardy, M. and Thivolet J. (1991). *In Vitro* and Post - Transplantation Differentiation of Human Keratinocytes Grown on the Human Type IV Collagen Film of a Bilayered Dermal Substitute. *Exp. Cell Res.* 193:310-319.

(32) Parenteau N.L., Bilbo P, Nolte CJ, Mason VS and Rosenberg M. (1992). The Organotypic Culture of Human Skin Keratinocytes and Fibroblasts to Achieve Form and Function. *Cytotech.* 9:163-171.

(33) Wilkins L.M., Watson SR, Prosky SJ, Meunier SF and Parenteau N.L. (1994). Development of a Bilayered Living Skin Construct for Clinical Applications. *Biotech. Bioeng.* 43/8*:*747-756.

(34) EpiSkin™ SOP (December 2011). *INVITTOX* Protocol (No 118). EpiSkin™ Skin Corrosivity Test.

(35) EpiDerm™ SOP (February 2012). Version MK-24-007-0024 Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Corrosion Test (EPI-200-SCT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm.

▼**M8**

(36) SkinEthic™ RHE SOP (January 2012). *INVITTOX* Protocol SkinEthic™ Skin Corrosivity Test.

(37) EpiCS® SOP (January 2012). Version 4.1 *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test Epidermal Skin Test 1000 (epiCS®) CellSystems.

(38) Alépée N., Barroso J., De Smedt A., De Wever B., Hibatallah J., Klaric M., Mewes K.R., Millet M., Pfannenbecker U., Tailhardat M., Templier M., and McNamee P. Use of HPLC/UPLC- spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in In Vitro Reconstructed Human Tissue (RhT)- based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29: 741-761.

(39) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. (May 2001). Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (25).

**Viabilidad celular**: Parámetro que mide la actividad total de una población celular como, por ejemplo, la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales celulares para reducir el colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo], que, según el parámetro que se mida y el diseño del ensayo realizado, se corresponde con el número total o con la vitalidad de las células vivas.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Concordancia**: Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo que da un resultado categorial, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «exactitud» se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todos los productos estudiados que se clasifican correctamente como positivos o negativos. La concordancia depende en gran medida de la prevalencia de positivos en los tipos de producto problema que se están examinando (25).

**$TE_{50}$:**: Puede estimarse determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % tras la administración del producto de referencia a una concentración fija determinada; véase también $CI_{50}$.

**SGA (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos)**: Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de respuesta a emergencias) y al medio ambiente (1).

**HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución.

**IATA**: Enfoque integrado de pruebas y evaluación (*Integrated Approach to Testing and Assessment*).

**$CI_{50}$:**: Puede estimarse determinando la concentración a la que un producto de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % ($CI_{50}$) tras un tiempo fijo de exposición; véase también $TE_{50}$.

**Dosis excesiva**: Cantidad de producto problema aplicada a la epidermis que supera a la cantidad necesaria para cubrir completa y uniformemente la superficie de la epidermis.

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta por dos o más sustancias en la cual no reaccionan.

**Sustancia de un solo componente**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

▼**M8**

**MTT**: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo.

**Sustancia de componentes múltiples:**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración > 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

**NC**: No corrosivo.

**Control $NSC_{muerto}$**: Control de color inespecífico en tejidos muertos.

**Control $NSC_{vivo}$**: Control de color inespecífico en tejidos vivos.

**NSMTT**: Reducción inespecífica del MTT.

**DO**: Densidad óptica.

**TP**: Testigo positivo, réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con un producto del que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Normas de comportamiento**: Normas, basadas en un método de referencia validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (25).

**Pertinencia**: Descripción de la relación del método de ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el método de ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (25).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (25).

**Tanda**: Una tanda consiste en el ensayo de uno o más productos problema al mismo tiempo que un testigo negativo y un TP.

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (25).

▼**M8**

**Corrosión cutánea *in vivo:***: Producción de una lesión irreversible de la piel; en particular, necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, como consecuencia de la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, hemorragias, costras sanguinolentas y, al cabo de 14 días de observación, cambio de coloración por palidez de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para evaluar las lesiones dudosas.

**Especificidad**: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (25).

**Sustancia**: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**UPLC**: Cromatografía líquida de ultraalta resolución.

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

▼M8

*Apéndice 2*

PRINCIPALES ELEMENTOS DE LOS MODELOS DE ENSAYO EHR VALIDADOS PARA LOS ENSAYOS DE CORROSIÓN CUTÁNEA

| Componentes del modelo de ensayo | EpiSkin™ | EpiDerm™ SCT | SkinEthic™ RHE | epiCS® |
|---|---|---|---|---|
| Superficie del modelo | 0,38 $cm^2$ | 0,63 $cm^2$ | 0,5 $cm^2$ | 0,6 $cm^2$ |
| Número de réplicas tisulares | Mínimo de 2 por tiempo de exposición | 2-3 por tiempo de exposición | Mínimo de 2 por tiempo de exposición | Mínimo de 2 por tiempo de exposición |
| Dosis de tratamiento y aplicación | Productos líquidos y viscosos: 50 µl ± 3 µl (131,6 µl/$cm^2$)<br><br>Productos sólidos: 20 ± 2 mg (52,6 mg/$cm^2$) + 100 µl ± 5µl de solución de NaCl (9 g/l)<br><br>Productos céreos/viscosos: 50 ± 2 mg (131,6 mg/$cm^2$) con malla de nailon | Productos líquidos: 50 µl (79,4 µl/$cm^2$) con malla de nailon o sin ella<br><br>*Antes del ensayo ha de comprobarse la compatibilidad del producto problema con la malla de nailon.*<br><br>Productos semisólidos: 50 µl (79,4 µl/$cm^2$)<br><br>Productos sólidos: 25 µl $H_2O$ (o más en caso necesario) + 25 mg (39,7 mg/$cm^2$)<br><br>Productos céreos: Disco plano de unos 8 mm de diámetro puesto sobre el tejido humedecido con 15 µl $H_2O$. | Productos líquidos y viscosos: 40 µl ± 3 µl (80 µl/$cm^2$) con malla de nailon<br><br>*Antes del ensayo ha de comprobarse la compatibilidad del producto problema con la malla de nailon.*<br><br>Productos sólidos: 20 µl ± 2µl $H_2O$ + 20 ± 3 mg (40 mg/$cm^2$)<br><br>Productos céreos/viscosos: 20 ± 3 mg (40 mg/$cm^2$) con malla de nailon | Productos líquidos: 50 µl (83,3 µl/$cm^2$) con malla de nailon<br><br>*Antes del ensayo ha de comprobarse la compatibilidad del producto problema con la malla de nailon.*<br><br>Productos semisólidos: 50 µl (83,3 µl/$cm^2$)<br><br>Productos sólidos: 25 mg (41,7 mg/$cm^2$) + 25 µl $H_2O$ (o más en caso necesario)<br><br>Productos céreos: Disco plano de unos 8 mm de diámetro puesto sobre el tejido humedecido con 15 µl $H_2O$. |
| Control previo en relación con la reducción directa del MTT | 50 µl (líquidos) o 20 mg (sólidos)+ 2 ml MTT<br><br>0,3 mg/ml de solución durante 180 ± 5 min A 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa<br><br>→ Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto en agua. | 50 µl (líquidos) o 25 mg (sólidos)+ 1 ml MTT<br><br>1 mg/ml de solución durante 60 min A 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa<br><br>→ Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación. | 40 µl (líquidos) o 20 mg (sólidos)+ 1 ml MTT<br><br>1 mg/ml de solución durante 180 ± 15 min a 37 °C, 5 % CO 2, 95 % de humedad relativa<br><br>→ Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación. | 50 µl (líquidos) o 25 mg (sólidos)+ 1 ml MTT<br><br>1 mg/ml de solución durante 60 min A 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa<br><br>→ Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación. |

▼M8

| Componentes del modelo de ensayo | EpiSkin™ | EpiDerm™ SCT | SkinEthic™ RHE | epiCS® |
|---|---|---|---|---|
| Control previo en relación con la interferencia de color | 10 µl (líquido) o 10 mg (sólido) + 90 µl de $H_2O$ mezclados durante 15 minutos a temperatura ambiente<br>→ Si la solución se colorea, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo. | 50 µl (líquido) o 25 mg (sólido) + 300 µl de $H_2O$ Durante 60 min a 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa<br>→ Si la solución se colorea, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo. | 40 µl (líquido) o 20 mg (sólido) + 300 µl de $H_2O$ mezclados durante 60 minutos a temperatura ambiente<br>→ Si el producto problema es de color, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo. | 50 µl (líquido) o 25 mg (sólido) + 300 µl de $H_2O$ Durante 60 min a 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa<br>→ Si la solución se colorea, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo. |
| Tiempo de exposición y temperatura | 3 min, 60 min (± 5 min) y 240 min (± 10 min)<br>En armario ventilado A temperatura ambiente (18-28 °C) | 3 minutos a temperatura ambiente, y 60 min A 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa | 3 minutos a temperatura ambiente, y 60 min A 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa | 3 minutos a temperatura ambiente, y 60 min A 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa |
| Aclarado | 25 ml 1x PBS (solución salina amortiguadora de fosfato) (2 ml/enjuague) | 20 veces con un flujo constante suave de 1x PBS | 20 veces con un flujo constante suave de 1 x PBS | 20 veces con un flujo constante suave de 1 x PBS |
| Testigo negativo | 50 µl de solución de NaCl (9 g/l)<br>Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición | 50 µl de $H_2O$<br>Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición | 40 µl de $H_2O$<br>Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición | 50 µl de $H_2O$<br>Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición |
| Testigo positivo | 50 µl de ácido acético glacial<br>Sometido al ensayo solo durante 4 horas | 50 µl de KOH 8 N<br>Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición | 40 µl de KOH 8 N<br>Sometido al ensayo solo durante 1 hora | 50 µl de KOH 8 N<br>Sometido al ensayo con cada tiempo de exposición |
| Solución de MTT | 2 ml de solución con 0,3 mg/ml | 300 µl de solución con 1 mg/ml | 300 µl de solución con 1 mg/ml | 300 µl de solución con 1 mg/ml |
| Tiempo y temperatura de incubación del MTT | 180 min (±15 min) a 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa | 180 min a 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa | 180 min (± 15 min) a 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa | 180 min a 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa |

▼M8

| Componentes del modelo de ensayo | EpiSkin™ | EpiDerm™ SCT | SkinEthic™ RHE | epiCS® |
|---|---|---|---|---|
| Disolvente de extracción | 500 µl de isopropanol acidificado<br>(HCl 0,04 N en isopropanol)<br>(tejido aislado en inmersión total) | 2 ml de isopropanol<br>(extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza) | 1,5 ml de isopropanol<br>(extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza) | 2 ml de isopropanol<br>(extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza) |
| Tiempo y temperatura de extracción | Una noche a temperatura ambiente, protegido de la luz | Una noche sin agitación a temperatura ambiente, o 120 min con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente | Una noche sin agitación a temperatura ambiente, o 120 min con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente | Una noche sin agitación a temperatura ambiente, o 120 min con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente |
| Lectura de la DO | 570 nm (545 - 595 nm) sin filtro de referencia | 570 nm (o 540 nm) sin filtro de referencia | 570 nm (540 - 600 nm) sin filtro de referencia | 540 - 570 nm sin filtro de referencia |
| Control de calidad del tejido | 18 horas de tratamiento con DSS<br>1,0 mg/ml ≤ $CI_{50}$ ≤ 3,0 mg/ml | Tratamiento con 1 % de tritón X-100<br>4,08 horas ≤ $TE_{50}$ ≤ 8,7 horas | Tratamiento con 1 % de tritón X-100<br>4,0 horas ≤ $TE_{50}$ ≤ 10,0 horas | Tratamiento con 1 % de tritón X-100<br>2,0 horas ≤ $TE_{50}$ ≤ 7,0 horas |
| Criterios de aceptabilidad | 1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo (NaCl) debe ser ≥ 0,6 y ≤ 1,5 con cada tiempo de exposición.<br>2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 4 horas con el testigo positivo (ácido acético glacial), expresada en % del testigo negativo, debe ser ≤ 20 %.<br>3. En el intervalo del 20 - 100 % de viabilidad y con DO ≥ 0,3, la diferencia de viabilidad entre las dos réplicas tisulares no debe superar el 30 %. | 1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo ($H_2O$) debe ser ≥ 0,8 y ≤ 2,8 con cada tiempo de exposición.<br>2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 1 hora con el testigo positivo (KOH 8 N), expresada en % del testigo negativo, debe ser < 15 %.<br>3. En el intervalo del 20 - 100 % de viabilidad, el coeficiente de variación (CV) entre las réplicas tisulares debe ser ≤ 30 % | 1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo ($H_2O$) debe ser ≥ 0,8 y ≤ 3,0 con cada tiempo de exposición.<br>2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 1 hora (y 4 horas, en su caso) con el testigo positivo (KOH 8 N), expresada en % del testigo negativo, debe ser < 15 %.<br>3. En el intervalo del 20 - 100 % de viabilidad y con DO ≥ 0,3, la diferencia de viabilidad entre las dos réplicas tisulares no debe superar el 30 %. | 1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo ($H_2O$) debe ser ≥ 0,8 y ≤ 2,8 con cada tiempo de exposición.<br>2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 1 hora con el testigo positivo (KOH 8 N), expresada en % del testigo negativo, debe ser < 20 %.<br>3. En el intervalo del 20 - 100 % de viabilidad y con DO ≥ 0,3, la diferencia de viabilidad entre las dos réplicas tisulares no debe superar el 30 %. |

▼**M8**

*Apéndice 3*

COMPORTAMIENTO DE LOS MODELOS DE ENSAYO RESPECTO A LA SUBCATEGORIZACIÓN

El cuadro que figura a continuación recoge el comportamiento de los cuatro modelos de ensayo calculado sobre la base de un conjunto de 80 productos químicos probados por los cuatro diseñadores de los ensayos. La Secretaría de la OCDE realizó los cálculos, que fueron revisados y aprobados por un subgrupo de expertos (21) (23).

Los modelos de ensayo EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™ y epiCS® permiten la subcategorización (es decir, 1A frente a 1B-y-1C y frente a NC).

Comportamientos, índices de sobreclasificación, índices de subclasificación y exactitud (capacidad de asignación) de los cuatro modelos de ensayo basados en un conjunto de 80 productos químicos sometidos todos ellos a ensayo durante 2 o 3 tandas en cada modelo de ensayo:

**ESTADÍSTICAS SOBRE LAS ASIGNACIONES OBTENIDAS CON TODO EL CONJUNTO DE PRODUCTOS**

(n = 80 productos sometidos a ensayo en 2 tandas independientes en el caso de epiCS® o 3 tandas independientes en el de EpiDerm™ SCT, EpiSkin™ y SkinEthic™ RHE, es decir, respectivamente 159 (*) o 240 clasificaciones)

| | EpiSkin™ | EpiDerm™ | SkinEthic™ | epiCS® |
|---|---|---|---|---|
| **Sobreclasificaciones:** | | | | |
| 1B-1C sobreclasificados como 1A | 21,50 % | 29,0 % | 31,2 % | 32,8 % |
| NC sobreclasificados como 1B y 1C | 20,7 % | 23,4 % | 27,0 % | 28,4 % |
| NC sobreclasificados como 1A | 0,00 % | 2,7 % | 0,0 % | 0,00 % |
| Sobreclasificados como Corr. | 20,7 % | 26,1 % | 27,0 % | 28,4 % |
| **Índice de sobreclasificación global (todas las categorías)** | **17,9 %** | **23,3 %** | **24,5 %** | **25,8 %** |
| **Subclasificaciones:** | | | | |
| 1A subclasificados como 1B y 1C | 16,7 % | 16,7 % | 16,7 % | 12,5 % |
| 1A subclasificados como NC | 0,00 % | 0,00 % | 0,00 % | 0,00 % |
| 1B y 1C subclasificados como NC | 2,2 % | 0,00 % | 7,5 % | 6,6 % |
| **Índice de subclasificación global (todas las categorías)** | **3,3 %** | **2,5 %** | **5,4 %** | **4,4 %** |
| **Clasificaciones correctas:** | | | | |
| 1A correctamente clasificados | 83,3 % | 83,3 % | 83,3 % | 87,5 % |
| 1B y 1C correctamente clasificados | 76,3 % | 71,0 % | 61,3 % | 60,7 % |
| NC correctamente clasificados | 79,3 % | 73,9 % | 73,0 % | 71,62 % |
| **Exactitud general** | **78,8 %** | **74,2 %** | **70 %** | **69,8 %** |

**NC**: No corrosivo.

(*) Un producto se sometió a ensayo una vez en relación con epiCS® por falta de disponibilidad (23).

▼**M8**

*Apéndice 4*

Parámetros clave y criterios de aceptación para considerar apto un sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC para la medición del formazano de MTT extraído del tejido de EHR

| Parámetro | Protocolo obtenido de las orientaciones de la FDA (37) (38) | Criterios de aceptación |
|---|---|---|
| Selectividad | Análisis de isopropanol, blanco vivo (extracto isopropanólico de tejidos vivos de EHR sin tratamiento), blanco muerto (extracto isopropanólico de tejidos muertos de EHR sin tratamiento) | $Área_{interferencia} \leq 20$ % del $Área_{LIC}$ [1] |
| Precisión | Controles de calidad (es decir, formazano de MTT a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml y 160 µg/ml) en isopropanol (n = 5) | CV ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC |
| Exactitud | Controles de calidad en isopropanol (n = 5) | % Desv ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC |
| Efecto de matriz | Controles de calidad con blanco vivo (n = 5) | 85 % ≤ efecto de matriz ≤ 115 % |
| Efecto residual | Análisis de isopropanol después de un patrón para el LSC[2] [2] | $Área_{interferencia} \leq 20$ % del $Área_{LIC}$ |
| Reproducibilidad (intradiaria) | Tres curvas de calibración independientes (sobre la base de 6 diluciones consecutivas a 1/3 de formazano de MTT en isopropanol, comenzando en el LSC, es decir, 200 µg/ml);<br>Controles de calidad en isopropanol (n = 5) | Curvas de calibración: % Desv ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC<br>Controles de calidad: % Desv ≤ 15 % y CV ≤ 15 % |
| Reproducibilidad (interdiaria) | Día 1: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)<br>Día 2: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)<br>Día 3: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) | |
| Estabilidad a corto plazo del formazano de MTT en el extracto de tejido de EHR | Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de 24 horas de conservación a temperatura ambiente | % Desv ≤ 15 % |
| Estabilidad a largo plazo del formazano de MTT en el extracto de tejido de EHR, en caso necesario | Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de varios días de conservación a la temperatura especificada (p.ej., 4°C, -20°C, -80°C) | % Desv ≤ 15 % |

([1]) LIC: Límite inferior de cuantificación, definido de forma que cubra una viabilidad tisular del 1-2 %, es decir, 0,8 µg/ml.
([2]) LSC: Límite superior de cuantificación, definido para ser, como mínimo, dos veces superior a la concentración más alta prevista de formazano de MTT en los extractos isopropanólicos de los testigos negativos, es decir, 200 µg/ml.

▼B

B.41. **ENSAYO DE FOTOTOXICIDAD *IN VITRO* 3T3 ARN (ABSORCIÓN DE ROJO NEUTRO)**

1. **MÉTODO**

El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 432 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

La fototoxicidad se define como una respuesta tóxica ante una sustancia aplicada al cuerpo que es provocada o aumentada (se hace perceptible a dosis menores) tras una exposición posterior a la luz, o que es inducida por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia.

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN se emplea para identificar el potencial fototóxico de una sustancia problema inducido por la sustancia excitada tras su exposición a la luz. El ensayo evalúa la fototoxicidad mediante la reducción relativa de la viabilidad de las células expuestas a la sustancia en presencia de luz, respecto a las expuestas en la oscuridad. Es probable que las sustancias identificadas mediante este ensayo sean fototóxicas *in vivo,* tras su aplicación sistémica seguida de su distribución a la piel, o tras una aplicación tópica.

Se han señalado numerosos tipos de sustancias químicas que producen efectos fototóxicos (1) (2) (3) (4). Tienen en común la capacidad de absorber energía luminosa del espectro de la luz solar. Con arreglo a la primera ley de la fotoquímica (ley de Grotthaus-Draper), para que se produzca una fotorreacción es necesaria la absorción suficiente de cuantos de luz. Por tanto, antes de plantearse la realización de ensayos biológicos, debe determinarse el espectro de absorción de luz UV/visible de la sustancia problema según las directrices de ensayo TG 101 de la OCDE. Se ha indicado la escasa probabilidad de que una sustancia sea fotorreactiva si su coeficiente de absorción/extinción molar es inferior a 10 litros × $mol^{-1}$ × $cm^{-1}$. Es posible que las sustancias de este tipo no tengan que someterse al ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN ni a ningún otro ensayo biológico de efectos fotoquímicos adversos (1) (5). Véase también a este respecto el anexo 1.

La fiabilidad y la pertinencia del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN se han evaluado recientemente (6) (7) (8) (9). Se ha comprobado que este ensayo sirve para predecir los efectos de fototoxicidad aguda *in vivo* en animales y en el hombre. Por el contrario, no está concebido para predecir otros efectos adversos que puedan deberse a la acción combinada de una sustancia y de la luz; así, por ejemplo, no se refiere a la fotogenotoxicidad, a la fotoalergia ni a la fotocarcinogénesis, y tampoco permite la evaluación de la potencia fototóxica. Tampoco se ha designado el ensayo para estudiar mecanismos indirectos de fototoxicidad, efectos de metabolitos de la sustancia problema ni efectos de mezclas.

Si bien en general es necesario utilizar sistemas de metabolización en todos los ensayos *in vitro* de predicción del potencial genotóxico o carcinogénico, en el caso de la fototoxicología hasta la fecha solo se conocen escasos ejemplos de que una sustancia química requiera una transformación metabólica para actuar como fototoxina *in vivo* o *in vitro.* Por consiguiente, no resulta necesario ni está fundado científicamente realizar el presente ensayo con un sistema de activación metabólica.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

**irradiancia** la intensidad de luz ultravioleta (UV) o visible que incide en una superficie, medida en $W/m^2$ o $mW/cm^2$;

**dosis de luz** la cantidad (= intensidad × tiempo) de radiación ultravioleta (UV) o visible que incide en una superficie, expresada en julios (= W × s) por unidad de superficie, por ejemplo $J/m^2$ o $J/cm^2$;

**bandas de luz UV** las siguientes designaciones recomendadas por la CIE *(Commission Internationale de l'Eclairage):* UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y UVC (100-280 nm); también se emplean otras designaciones: la separación entre UVB y UVA se sitúa con frecuencia en 320 nm y las radiaciones UVA pueden subdividirse en UV-A1 y UV-A2, con una separación a 340 nm aproximadamente;

**viabilidad celular** el parámetro que mide la actividad total de una población celular (por ejemplo, absorción del colorante vital rojo neutro por los lisosomas celulares), que, según el efecto que se mida y el tipo de ensayo realizado, se corresponde con el número total o con la vitalidad de las células;

**viabilidad celular relativa** la viabilidad celular respecto a la de los controles negativos (disolvente) que se someten a todo el procedimiento de ensayo (+ Irr o - Irr), pero no se tratan con la sustancia problema;

**PIF *(Photo Irritation Factor* — factor de fotoirritación)** el factor que se obtiene comparando dos concentraciones citotóxicas igualmente eficaces (CI50) de la sustancia problema con irradiación no citotóxica de luz UVA/visible (+ Irr) y sin dicha irradiación (- Irr);

$CI_{50}$ la concentración de la sustancia problema a la que la viabilidad celular se reduce en un 50 %;

**MPE *(Mean Photo Effect* — fotoefecto medio)** la medida derivada del análisis matemático de las curvas respuesta-concentración obtenidas con una irradiación no citotóxica de luz UVA/visible (+ Irr) y sin dicha irradiación (- Irr);

**fototoxicidad** la reacción tóxica aguda provocada tras una primera exposición de la piel a determinadas sustancias químicas y su posterior exposición a la luz, o inducida análogamente por irradiación de la piel tras la administración sistémica de una sustancia química.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN se basa en la comparación de la citotoxicidad de una sustancia cuando se somete a ensayo con exposición y sin exposición a una dosis no citotóxica de luz solar simulada. La citotoxicidad en este ensayo se expresa como la disminución, ligada a la concentración, de la absorción del colorante vital rojo neutro a las 24 horas de la administración de la sustancia problema y la irradiación (10). El rojo neutro es un colorante catiónico débil que penetra fácilmente a través de las membranas celulares por un mecanismo distinto de la difusión, y se acumula intracelularmente en los lisosomas. Las alteraciones de la superficie de la sensible membrana de los lisosomas provocan un aumento de la fragilidad de estos, junto con otros cambios que gradualmente se van haciendo irreversibles. Tales cambios inducidos por la acción de agentes xenobióticos ocasionan un descenso de la absorción y fijación del rojo neutro, con lo que es posible distinguir entre células viables, lesionadas y muertas, lo que constituye la base del ensayo.

▼B

Se mantienen en cultivo células Balb/c 3T3 durante 24 horas para que se formen monocapas. Se preincuban durante 1 hora dos placas de 96 pocillos por sustancia problema, con 8 concentraciones diferentes de esta sustancia. Después se expone una de las dos placas a la dosis máxima de irradiación no citotóxica, mientras que la otra placa se mantiene a oscuras. A continuación se sustituye en ambas placas el medio de tratamiento por medio de cultivo y, tras otras 24 horas de incubación, se determina la viabilidad celular mediante la absorción de rojo neutro. La viabilidad celular se expresa en porcentaje respecto a los controles de disolvente sin tratar y se calcula para cada una de las concentraciones del ensayo. Para predecir el potencial fototóxico, se comparan las respuestas a las distintas concentraciones obtenidas con y sin irradiación, por lo general al nivel $CI_{50}$, es decir, a la concentración que reduce la viabilidad celular en un 50 % respecto a los controles sin tratar.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Preparación**

1.4.1.1. *Células*

En el estudio de validación se utilizó una línea celular de fibroblastos permanentes de ratón, la Balb/c 3T3, clon 31, bien de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA, EEUU, o bien de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Salisbury, Wiltshire, RU, por lo que se recomienda obtenerla de una colección reconocida. También pueden utilizarse con el mismo protocolo de ensayo otras células o líneas celulares, siempre y cuando las condiciones de cultivo se adapten a las necesidades particulares de las células, si bien en tal caso debe demostrarse la equivalencia de los resultados.

Debe comprobarse periódicamente que las células están libres de contaminación por micoplasmas y solo se utilizarán si se confirma la ausencia de estos microorganismos (11).

Es importante comprobar periódicamente la sensibilidad de las células a las radiaciones UV conforme al procedimiento de control de calidad descrito en el presente método. Dado que la sensibilidad de las células a las radiaciones UVA puede aumentar con el número de pases, deben emplearse células Balb/c 3T3 sometidas al menor número posible de pases, preferentemente menos de 100. (Véanse el punto 1.4.2.2.2 y el anexo 2).

1.4.1.2. *Medios y condiciones de cultivo*

Deben emplearse medios de cultivo y condiciones de incubación apropiados para los pases celulares corrientes y durante el ensayo; por ejemplo, en el caso de células Balb/c 3T3, el medio de cultivo es DMEM *(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)* enriquecido con un 10 % de suero de ternera recién nacida, glutamina 4 mM, penicilina (100 UI) y estreptomicina (100 µg/ml), y la incubación ha de hacerse en atmósfera humidificada, a 37 $^{o}$C, con 5-7,5 % de $CO_2$ según el amortiguador (véase el segundo párrafo del punto 1.4.1.4). Es particularmente importante que las condiciones del cultivo celular permitan mantener la duración del ciclo celular dentro de los límites normales conocidos de la línea celular o las células utilizadas.

1.4.1.3. *Preparación de los cultivos*

Se siembran en medio de cultivo, a una densidad apropiada, células procedentes de cultivos madre congelados y se subcultivan al menos una vez antes de utilizarlas en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN.

▼B

Para el ensayo de fototoxicidad, las células se siembran en el medio de cultivo a una densidad apropiada de manera que los cultivos no confluyan antes de que finalice el ensayo, es decir, cuando se determine la viabilidad celular 48 horas después de la siembra celular. Para las células Balb/c 3T3 cultivadas en placas de 96 pocillos, se recomienda una densidad de siembra de $1 \times 10^4$ células por pocillo.

Por cada sustancia problema se siembran las células de igual modo en dos placas distintas de 96 pocillos, que se mantendrán en paralelo en condiciones de cultivo idénticas a lo largo de todo el ensayo, excepto durante el tiempo en que una de ellas se irradia (+ Irr) y la otra se mantiene en la oscuridad (- Irr).

1.4.1.4. *Preparación de la sustancia problema*

Las sustancias problema deben prepararse justo antes de su empleo, salvo que se disponga de datos que demuestren que pueden conservarse estables. Se recomienda efectuar todas las manipulaciones químicas y el tratamiento inicial de las células en unas condiciones luminosas que eviten la fotoactivación o la degradación de la sustancia problema antes de la irradiación.

Las sustancias problema se disuelven en soluciones salinas amortiguadoras, como la solución salina equilibrada de Earle *(Earle's Balanced Salt Solution,* EBSS) u otras soluciones amortiguadoras equilibradas fisiológicamente, que no deben contener componentes proteínicos ni absorbentes de la luz (por ejemplo, colorantes indicadores de pH y vitaminas), con el fin de evitar interferencias durante la irradiación. Como durante la irradiación las células se mantienen unos 50 minutos fuera de la incubadora de $CO_2$, debe tenerse cuidado para evitar la alcalinización. Si se utilizan amortiguadores débiles, como la EBSS, esto puede conseguirse incubando las células con un 7,5 % de $CO_2$. Si las células se incuban solo con un 5 % de $CO_2$, debe elegirse un amortiguador más fuerte.

Las sustancias problema de hidrosolubilidad limitada deben disolverse en un disolvente adecuado. Si se emplea un disolvente, debe encontrarse a un volumen constante en todos los cultivos, es decir, en los controles negativos (disolvente) y en todas las concentraciones de la sustancia problema, y a esa concentración no debe ser citotóxico. Las concentraciones de la sustancia problema deben elegirse de manera que se evite la aparición de precipitados o de turbidez.

Se recomienda el uso de los disolventes dimetilsulfóxido (DMSO) y etanol (EtOH). También pueden ser útiles otros disolventes de baja citotoxicidad. Antes de utilizar cualquier disolvente, hay que comprobar ciertas propiedades del mismo como, por ejemplo, su capacidad de reacción con la sustancia problema, de atenuación del efecto fototóxico, de captación de radicales, o la estabilidad de la sustancia en el disolvente.

Para facilitar la solubilización puede utilizarse un agitador mecánico, un baño de ultrasonidos o el calentamiento a temperatura adecuada, siempre que no se altere la estabilidad de la sustancia problema.

▼B

1.4.1.5. *Condiciones de irradiación*

1.4.1.5.1. Fuente luminosa

En el ensayo de fototoxicidad, es fundamental la elección de una fuente luminosa y de unos filtros adecuados. La luz de las regiones visible y UVA suele relacionarse con reacciones fototóxicas *in vivo* (3) (12), mientras que generalmente la UVB reviste menor importancia pero es muy citotóxica; la citotoxicidad se multiplica por 1 000 cuando la longitud de onda pasa de 313 a 280 nm (13). Entre los criterios para elegir una fuente luminosa adecuada debe figurar el requisito de que esta emita longitudes de onda absorbidas por la sustancia problema (espectro de absorción) y que la dosis de luz (conseguida en un tiempo de exposición razonable) sea suficiente para detectar sustancias fotocitotóxicas conocidas. Además, las longitudes de onda y las dosis empleadas no han de ser excesivamente nocivas para el sistema de ensayo, por ejemplo debido a la emisión de calor (región del infrarrojo).

Se considera que la mejor fuente luminosa artificial son los simuladores solares. La distribución de potencia de irradiación del simulador solar filtrado debe parecerse a la de la luz diurna al aire libre que se indica en (14). Se utilizan como simuladores solares tanto los arcos de xenón como los arcos de haluro metálico y mercurio (cebado) (15). Estos últimos presentan la ventaja de emitir menos calor y de ser más baratos, pero no reproducen la luz solar tan bien como los arcos de xenón. Dado que todos los simuladores solares emiten cantidades importantes de rayos UVB, deben emplearse los filtros adecuados para atenuar estas longitudes de onda altamente citotóxicas. Debido a que el material plástico para cultivo celular contiene estabilizadores de UV, el espectro debe medirse a través del mismo tipo de tapa de placa de 96 pocillos que se vaya a utilizar en el ensayo. Independientemente de las medidas tomadas para atenuar partes del espectro mediante filtración o mediante efectos filtrantes inevitables del equipo, el espectro registrado por debajo de estos filtros no debe desviarse de la luz diurna al aire libre normalizada (14). En (8) y (16) se recoge un ejemplo de la distribución de la irradiancia espectral del simulador solar con filtro utilizado en el estudio de validación del ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN. Véase también la figura 1 del anexo 2.

1.4.1.5.2. Dosimetría

La intensidad de la luz (irradiancia) debe comprobarse periódicamente antes de cada ensayo de fototoxicidad utilizando un medidor adecuado de UV de banda ancha. La intensidad debe medirse a través del mismo tipo de tapa de placa de 96 pocillos que se vaya a utilizar en el ensayo. El medidor de UV tiene que haberse calibrado en función de la fuente luminosa. Ha de comprobarse el correcto funcionamiento de dicho aparato, para lo cual se recomienda utilizar otro medidor de UV de referencia, del mismo tipo y calibrado de igual manera. Lo ideal, a intervalos mayores, sería emplear un espectrorradiómetro para medir la irradiancia espectral de la fuente luminosa filtrada y comprobar el calibrado del medidor de UV de banda ancha.

Se ha visto que una dosis de 5 J/cm$^2$ (medida en la región UVA) no es citotóxica para las células Balb/c 3T3 y tiene la potencia suficiente de excitación de sustancias químicas para producir reacciones fototóxicas (6) (17), por ejemplo para conseguir 5 J/cm$^2$ dentro de un plazo de 50 min, se ajustó la irradiancia a 1,7 mW/cm$^2$. Véase la figura 2 del anexo 2. Si se utiliza otra línea celular o una fuente luminosa diferente, es posible que la dosis de irradiación haya de calibrarse de manera que pueda elegirse un régimen de dosis inocuas para las células pero suficientes para excitar fototoxinas de referencia. La duración de la exposición a la luz se calcula de la manera siguiente:

▼B

$$t(\text{min}) = \frac{\text{dosis de irradiación } (J/cm^2) \times 1000}{\text{irradiancia } (mW/cm^2) \times 60} \quad (1\ J = 1\ Ws)$$

1.4.2. **Condiciones del ensayo**

1.4.2.1. *Concentraciones de la sustancia problema*

Las gamas de concentraciones de la sustancia estudiada en presencia (+ Irr) y en ausencia (- Irr) de luz deben determinarse de forma adecuada mediante experimentos destinados a este fin. Puede ser útil evaluar la solubilidad al principio y a los 60 minutos (o el tiempo correspondiente al tratamiento que se vaya a utilizar), ya que la solubilidad puede cambiar a lo largo del tiempo o durante el proceso de exposición. Para evitar la toxicidad debida a unas condiciones de cultivo inadecuadas o a la presencia de sustancias muy ácidas o alcalinas, el pH de los cultivos celulares con la sustancia problema debe situarse entre 6,5 y 7,8.

La concentración máxima de la sustancia problema debe respetar las condiciones fisiológicas de la prueba; por ejemplo, han de evitarse las tensiones osmóticas y de pH. Según la sustancia problema, puede ser necesario estudiar otras propiedades físico-químicas como posibles factores de limitación de la concentración máxima. Cuando se trate de sustancias relativamente insolubles que no sean tóxicas a concentraciones de hasta el punto de saturación, debe utilizarse la concentración máxima que se pueda conseguir. En general, debe evitarse la precipitación de la sustancia problema en cualquiera de las concentraciones del ensayo. La concentración máxima de una sustancia problema no debe superar los 1 000 μg/ml y la osmolaridad no debe pasar de 10 mmolar. Debe utilizarse una serie de diluciones geométricas de 8 concentraciones de la sustancia problema con un factor de dilución constante (véase el punto 2.1, párrafo segundo).

Si se sabe (por un experimento de determinación de la gama de concentraciones) que la sustancia problema no es citotóxica hasta la concentración límite en el experimento sin luz (- Irr), pero es muy citotóxica cuando se ha irradiado (+ Irr), la gama de concentraciones que debe seleccionarse para el experimento (+ Irr) puede ser diferente de la elegida para el experimento (- Irr) a fin de cumplir los requisitos de calidad de los datos.

1.4.2.2. *Controles*

1.4.2.2.1. Sensibilidad de las células ante la radiación; obtención de datos previos

Debe comprobarse periódicamente (más o menos, cada cinco pases) la sensibilidad de las células ante la fuente luminosa, evaluando su viabilidad tras la exposición a dosis crecientes de radiación. En esta evaluación deben utilizarse varias dosis de radiación, incluyendo dosis sustancialmente más elevadas que las utilizadas en el ensayo de toxicidad 3T3 ARN. Lo más fácil es cuantificar estas dosis por mediciones de la banda UV de la fuente luminosa. Las células se siembran a la densidad utilizada en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN y se irradian al día siguiente. La viabilidad de las células se determina un día después mediante la absorción de rojo neutro. Debe demostrarse que la dosis máxima no citotóxica obtenida (por ejemplo, en el estudio de validación: 5 J/cm$^2$ [UVA]) es suficiente para clasificar correctamente las sustancias de referencia (cuadro 1).

▼B

1.4.2.2.2. Sensibilidad ante la radiación; comprobación del ensayo en curso

El ensayo cumple los criterios de calidad si los controles negativos/de disolvente irradiados presentan una viabilidad superior al 80 % respecto a los controles negativos/de disolvente no irradiados.

1.4.2.2.3. Viabilidad de los controles de disolvente

La densidad óptica absoluta ($DO_{540\ ARN}$) del rojo neutro extraído de los controles de disolvente indica si las $1 \times 10^4$ células sembradas por pocillo han crecido con un tiempo de generación normal durante los dos días del ensayo. Un ensayo cumple los criterios de aceptación si la media de la $DO_{540\ ARN}$ de los controles sin tratar es > 0,4 (es decir, unas 20 veces la absorbancia de fondo del disolvente).

1.4.2.2.4. Control positivo

Por cada ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN, debe someterse a ensayo en paralelo una sustancia fototóxica conocida. Se recomienda el uso de la clorpromazina (CPZ). Se han definido los criterios de aceptación siguientes para el uso de CPZ conforme al protocolo normalizado en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN: CPZ irradiada (+ Irr), $CI_{50}$ = 0,1 a 2,0 µg/ml; CPZ no irradiada (- Irr), $CI_{50}$ = 7,0 a 90,0 µg/ml. El factor de fotoirritación (PIF) debe ser > 6. Deben supervisarse los datos previos sobre el comportamiento del control positivo.

En lugar de la clorpromazina, pueden emplearse para los controles positivos en paralelo otras sustancias fototóxicas que convengan a la clase química o a las características de solubilidad de la sustancia estudiada.

1.4.3. **Procedimiento del ensayo (6) (7) (8) (16) (17)**

1.4.3.1. *1$^{er}$ día*

Se ponen 100 µl de medio de cultivo en los pocillos periféricos de una placa de microvaloración de cultivo tisular de 96 pocillos (= blancos). En los demás pocillos se vierten 100 µl de una suspensión de $1 \times l0^5$ células/ml en medio de cultivo (= $1 \times 10^4$ células/pocillo). Deben prepararse dos placas con cada serie de concentraciones de las distintas sustancias problema, así como de los controles positivos y de disolvente.

Se incuban las células durante 24 horas (véase el punto 1.4.1.2) hasta que formen una monocapa semiconfluyente. Este período de incubación permite la recuperación, la adherencia y el crecimiento exponencial de las células.

1.4.3.2. *2$^{o}$ día*

Tras la incubación, se decanta el medio de cultivo separándolo de las células y se lava cuidadosamente con 150 µl de la solución amortiguadora utilizada para la dilución. Se añaden 100 µl de la solución amortiguadora con la concentración adecuada de la sustancia problema o del disolvente (control de disolvente). Se utilizan 8 concentraciones distintas de la sustancia problema. Se incuban las células con la sustancia problema en la oscuridad durante 60 minutos (véanse el punto 1.4.1.2 y el punto 1.4.1.4, segundo párrafo).

De las dos placas preparadas con cada serie de concentraciones de la sustancia problema y con los controles, se elige una, generalmente al azar, para la determinación de la citotoxicidad (- Irr) (es decir, la placa de control), y otra (la placa de tratamiento) para la determinación de la fotocitotoxicidad (+ Irr).

▼B

Para efectuar la exposición + Irr, se someten las células a la dosis máxima de radiación que no es citotóxica, durante 50 minutos, a través de la tapa de la placa de 96 pocillos, a temperatura ambiente (véase también el anexo 2). Las placas que no se irradian (- Irr) se mantienen a temperatura ambiente en la oscuridad durante 50 minutos (= tiempo de exposición a la luz).

Se decanta la solución de ensayo y se lava cuidadosamente dos veces con 150 µl de la solución amortiguadora utilizada para la incubación, pero sin sustancia problema. Se sustituye la solución amortiguadora por medio de cultivo y se incuban (véase el punto 1.4.1.2.) hasta el día siguiente (18-22 horas).

1.4.3.3. *3$^{er}$ día*

1.4.3.3.1. Evaluación microscópica

Deben examinarse las células atendiendo a su crecimiento y morfología, así como a la integridad de la monocapa, utilizando un microscopio de contraste de fase. Deben registrarse los cambios en la morfología y los efectos sobre el crecimiento de las células.

1.4.3.3.2. Ensayo de absorción de rojo neutro

Se lavan las células con 150 µl de solución amortiguadora previamente calentada. Se elimina la solución de lavado con unos golpecitos suaves. Se añaden 100 µl de una solución de 50 µg/ml de rojo neutro (RN) (clorhidrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina, número EINECS 209-035-8; número CAS 553-24-2; C.I. 50040) en medio de cultivo sin suero (16) y se incuba durante 3 horas como se indica en el punto 1.4.1.2. Tras la incubación, se elimina el medio de RN y se lavan las células con 15 µL de la solución amortiguadora. Se decanta y se elimina el exceso de solución amortiguadora con material absorbente o por centrifugación.

Se añaden exactamente 150 µl de solución de desorción de RN (recién preparada con 49 partes de agua + 50 partes de etanol + 1 parte de ácido acético).

Se agita suavemente la placa de microvaloración en un agitador de placas durante 10 minutos, hasta que el RN se haya extraído de las células y forme una solución homogénea.

Se mide la densidad óptica del extracto de RN a 540 nm en un espectrofotómetro, utilizando los blancos como referencia. Los datos se conservan en un archivo electrónico adecuado para su análisis posterior.

2. **DATOS**

2.1. CALIDAD Y CANTIDAD DE LOS RESULTADOS

Los datos del ensayo deben permitir el análisis significativo de la relación respuesta-oncentración con y sin irradiación, y, a ser posible, determinar la concentración de la sustancia problema a la que se reduce al 50 % la viabilidad de las células ($CI_{50}$). Si se comprueba que hay citotoxicidad, tanto la gama de concentraciones como el intervalo entre las distintas concentraciones deben establecerse de manera que se pueda ajustar una curva a los datos experimentales.

En caso de resultados tanto claramente positivos como claramente negativos (véase el punto 2.3, párrafo primero), puede ser suficiente el experimento primario, con el apoyo de uno o más experimentos previos para determinar la gama de las dosis.

▼B

En caso de resultados ambiguos, en el límite o dudosos deben hacerse más ensayos (véase también el punto 2.4, párrafo segundo). En tal caso, debe plantearse la modificación de las condiciones experimentales. Entre las condiciones que podrían modificarse figuran la gama de concentraciones o sus intervalos, el tiempo de preincubación y la duración de la exposición a la radiación. En el caso de las sustancias inestables en el agua puede ser conveniente reducir dicha duración.

2.2. EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para permitir la evaluación de los resultados, puede calcularse el factor de fotoirritación (PIF) o el fotoefecto medio (MPE).

Para calcular las medidas de fotocitotoxicidad (véase más abajo) hay que trazar una curva continua y adecuada respuesta-concentración (modelo) que se aproxime al conjunto de valores discretos de respuestas a las concentraciones. El ajuste de la curva a los datos se suele hacer mediante un método de regresión no lineal (18). Para evaluar la influencia de la variabilidad de los datos sobre la curva ajustada se recomienda un procedimiento *bootstrap*.

El factor de fotoirritación (PIF) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\mathrm{PIF} = \frac{\mathrm{IC}_{50}(-\mathrm{Irr})}{\mathrm{IC}_{50}(+\mathrm{Irr})}$$

Si no puede calcularse la $CI_{50}$ en presencia o en ausencia de luz, no es posible determinar el PIF de la sustancia problema. El fotoefecto medio (MPE) se basa en la comparación de las curvas completas respuesta-concentración (19). Se define como la media ponderada de un conjunto representativo de valores de fotoefecto.

$$\mathrm{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i \mathrm{PE}_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

El fotoefecto $PE_c$ a una concentración C se define como el producto del efecto de respuesta $RE_c$ por el efecto de dosis $DE_c$; es decir, $PE_c = RE_c \times DE_c$. El efecto de respuesta $RE_c$ es la diferencia entre las respuestas observadas en ausencia y en presencia de luz, es decir $RE_c = R_c$ (- Irr) — $R_c$ (+ Irr). El efecto de dosis viene dado por la fórmula siguiente:

$$\mathrm{DE}_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

donde C* representa la concentración equivalente, es decir, la concentración a la que la respuesta + Irr iguala a la respuesta - Irr a la concentración C. Si C* no puede determinarse porque los valores de respuesta de la curva + Irr son sistemáticamente más altos o más bajos que RC(- Irr), el efecto de dosis se fija en 1. Los factores de ponderación $w_i$ vienen dados por el valor máximo de respuesta, es decir, $w_i$ = MAX {$R_i$ (+ Irr), $R_i$ (- Irr)}. El cuadro de concentraciones $C_i$ se elige de forma que caiga el mismo número de puntos en cada uno de los intervalos de concentración definidos por los valores de concentración utilizados en el experimento. El cálculo del MPE se limita al valor máximo de concentración al que al menos una de las dos curvas sigue mostrando un valor de respuesta de al menos el 10 %. Si esta concentración máxima es más elevada que la concentración más alta utilizada en el experimento + Irr, la parte residual de la curva + Irr se fija en el valor de respuesta «0». En función de que el valor de MPE sea o no mayor que un valor límite adecuadamente elegido ($MPE_c$ = 0,15), la sustancia se clasifica como fototóxica o no.

▼B

En la referencia (20) puede obtenerse un programa informático para el cálculo de PIF y MPE.

2.3. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Según el estudio de validación (8), una sustancia problema con un PIF < 2 o un MPE < 0,1 no es fototóxica. Un PIF > 2 y < 5 o un MPE > 0,1 y < 0,15 indica fototoxicidad probable, y un PIF > 5 o un MPE > 0,15 indica fototoxicidad.

Cualquier laboratorio que efectúe este ensayo por primera vez debe hacerlo con las sustancias de referencia del cuadro 1 antes de proceder al ensayo de la fototoxicidad de sustancias problema. Los valores de PIF o MPE deben ser similares a los valores indicados en el cuadro 1.

**Cuadro 1**

| Nombre químico | Nº EINECS | Nº CAS | PIF | MPE | Pico de absorción | Disolvente (1) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Amiodarona HCl | 243-293-2 | [19774-82-4] | > 3,25 | 0,27-0,54 | 242 nm<br>300 nm (hombro) | etanol |
| Clorpromazina HCl | 200-701-3 | [69-09-0] | > 14,4 | 0,33-0,63 | 309 nm | etanol |
| Norfloxacina | 274-614-4 | [70458-96-7] | > 71,6 | 0,34-0,90 | 316 nm | acetonitrilo |
| Antraceno | 204-371-1 | [120-12-7] | > 18,5 | 0,19-0,81 | 356 nm | acetonitrilo |
| Protoporfirina IX, disodio | 256-815-9 | [50865-01-5] | > 45,3 | 0,54-0,74 | 402 nm | etanol |
| L-histidina | | [7006-35-1] | sin PIF | 0,05-0,10 | 211 nm | agua |
| Hexaclorofeno | 200-733-8 | [70-30-4] | 1,1-1,7 | 0,00-0,05 | 299 nm<br>317 nm (hombro) | etanol |
| Laurilsulfato de sodio | 205-788-1 | [151-21-3] | 1,0-1,9 | 0,00-0,05 | sin absorción | agua |

(1) Disolvente utilizado para medir la absorción.

2.4. INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Si se observan efectos fotocitotóxicos solo a la mayor concentración de ensayo (especialmente en caso de sustancias problema hidrosolubles), para la evaluación del peligro puede ser necesario tener en cuenta otros aspectos, entre los que se pueden incluir datos sobre la absorción cutánea y la acumulación de la sustancia en la piel, así como datos procedentes de otros ensayos, como el del efecto de la sustancia *in vitro* sobre piel humana o animal, o sobre modelos de piel.

▼B

Si no se pone de manifiesto ningún efecto tóxico (+ Irr y - Irr) y si la baja solubilidad limita las concentraciones que se pueden utilizar en el ensayo, puede dudarse de la compatibilidad de la sustancia problema con el ensayo y ha de estudiarse la posibilidad de efectuar un ensayo de confirmación, por ejemplo con otro modelo.

3. **INFORMES**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— identificación, nombres genéricos comunes y números IUPAC y CAS, si se saben,

— naturaleza física y pureza,

— propiedades físico-químicas importantes para la realización del estudio,

— espectro de absorción UV/visible,

— estabilidad y fotoestabilidad, si se conocen.

Disolvente:

— justificación de la elección del disolvente,

— solubilidad de la sustancia problema en el disolvente,

— porcentaje de disolvente presente en el medio de tratamiento.

Células:

— tipo y procedencia,

— ausencia de micoplasmas,

— número de pases celulares, si se conoce;

— sensibilidad de las células a la radiación, determinada con el equipo de irradiación utilizado en el ensayo de fototoxicidad *in vitro* 3T3 ARN.

Condiciones de la prueba (1); *incubación antes y después del tratamiento:*

— tipo y composición del medio de cultivo,

— condiciones de incubación (concentración de $CO_2$, temperatura y humedad),

— duración de la incubación (antes y después del tratamiento).

Condiciones de la prueba (2); *tratamiento con la sustancia:*

— fundamento de la elección de las concentraciones de la sustancia problema empleadas en presencia y en ausencia de radiación,

— en caso de que la sustancia problema sea escasamente soluble y no sea citotóxica: fundamento de la elección de la mayor concentración empleada,

— tipo y composición del medio de tratamiento (solución salina amortiguadora),

— duración del tratamiento con la sustancia.

Condiciones de la prueba (3); *irradiación:*

— fundamento de la elección de la fuente luminosa empleada,

▼B

— fabricante y tipo de la fuente luminosa y del radiómetro,

— características de la irradiancia espectral de la fuente luminosa,

— características de transmisión y absorción del filtro o filtros utilizados,

— características del radiómetro y condiciones de calibrado,

— distancia entre la fuente luminosa y el sistema de ensayo,

— irradiancia UVA a esa distancia, expresada en $mW/cm^2$,

— duración de la exposición a la luz UV/visible,

— dosis de radiación UVA (irradiancia × tiempo), expresada en $J/cm^2$,

— temperatura de los cultivos celulares durante su irradiación y de los mantenidos en la oscuridad en paralelo.

Condiciones de la prueba (4); *ensayo de viabilidad con rojo neutro:*

— composición del medio de tratamiento para el ensayo con rojo neutro,

— duración de la incubación con rojo neutro,

— condiciones de incubación (concentración de $CO_2$, temperatura y humedad),

— condiciones de extracción del rojo neutro (agente de extracción, duración),

— longitud de onda empleada para la lectura espectrofotométrica de la densidad óptica del rojo neutro,

— segunda longitud de onda (referencia), si procede,

— contenido del blanco del espectrofotómetro, si procede.

Resultados:

— viabilidad celular obtenida con cada concentración de la sustancia problema, expresada en porcentaje de la viabilidad media de los controles con disolventes en paralelo,

— curvas respuesta-concentración (viabilidad celular relativa frente a la concentración de la sustancia problema), obtenidas en los experimentos + Irr y - Irr realizados en paralelo,

— análisis de las curvas respuesta-concentración: si es posible, cálculo de la $CI_{50}$ (+ Irr) y de la $CI_{50}$ (- Irr),

— comparación de las dos curvas respuesta-concentración obtenidas con y sin irradiación, calculando bien el factor de fotoirritación (PIF) o bien el fotoefecto medio (MPE),

— criterios de aceptación del ensayo; control con el disolvente en paralelo:

— viabilidad absoluta (densidad óptica del extracto de rojo neutro) de las células irradiadas y no irradiadas,

— datos anteriores sobre controles negativos y de disolvente, medias y desviaciones típicas.

— criterios de aceptación del ensayo; control positivo en paralelo:

▼B

— $CI_{50}$ (+ Irr) y $CI_{50}$ (- Irr) y PIF/MPE de la sustancia del control positivo;

— datos anteriores sobre la sustancia del control positivo: $CI_{50}$ (+ Irr) y $CI_{50}$ (- Irr) y PIF/MPE, medias y desviaciones típicas.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**


1. Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95-102.

2. Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In «Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry» Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI-XXXV.

3. Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, *22,* 314-348.

4. Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In «The science of Photobiology» Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79-110.

5. OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.7 «Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water» Environment Directorate, OECD, Paris.

6. Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793-796.

7. Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3 November 1997, ATLA, 26, 7-8.

8. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305-327.

9. OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, $30^{th}$-$31^{th}$ October 2001, Secretariat's Final Summary Report, $15^{th}$ March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

10. Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24,119-124.

11. Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225-237.

▼B

12. Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In «Dermatotoxicology», edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p. 515-530.

13. Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825-1829.

14. ISO 10977. (1993). Photography — Processed photographic colour films and paper prints — Methods for measuring image stability.

15. Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3900734275

16. ZEBET/ECVAM/COLIPA — Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

17. Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679-708.

18. Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127-138.

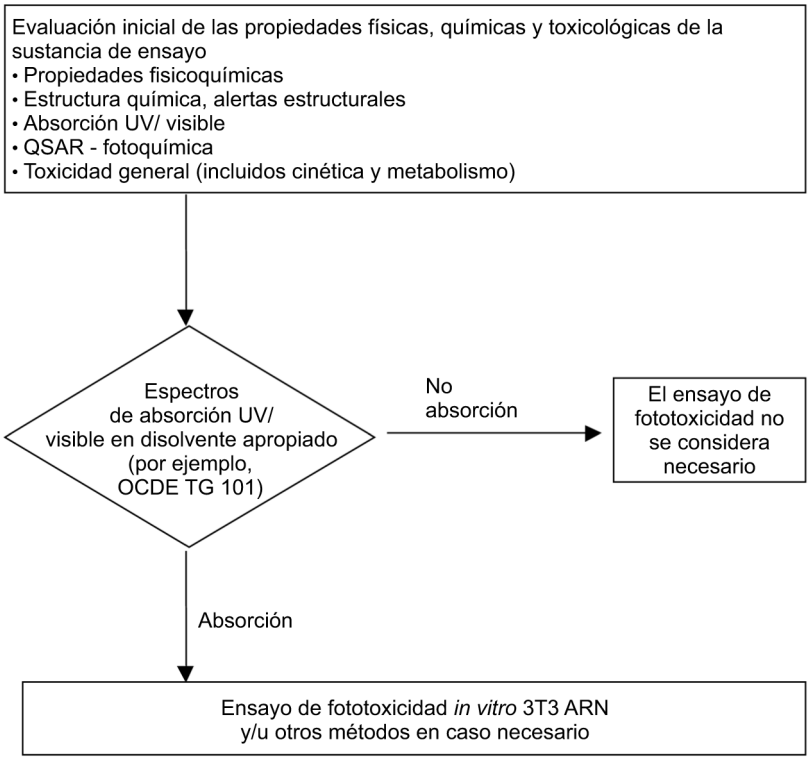
19. Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445-462.

20. http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_ 2649 34377 2349687_ 1_1_1_1, 00.html

▼B

*ANEXO 1*

**Función del ensayo de fototoxicidad 3T3 ARN en un enfoque secuencial de los ensayos de fototoxicidad de sustancias químicas**

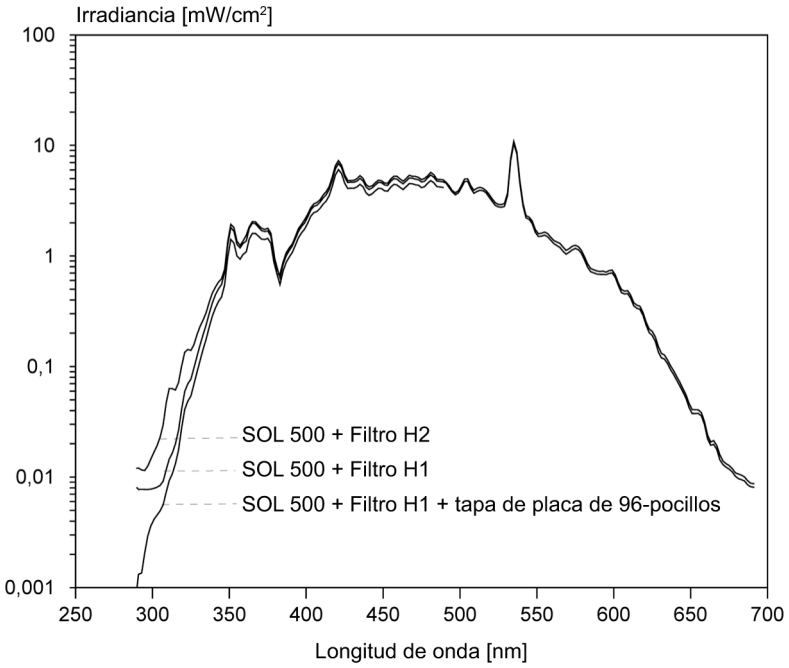


▼B

*ANEXO 2*

**Figura 1**

**Distribución espectral de potencia de un simulador solar con filtro**




(véase el punto 1.4.1.5, párrafo segundo)

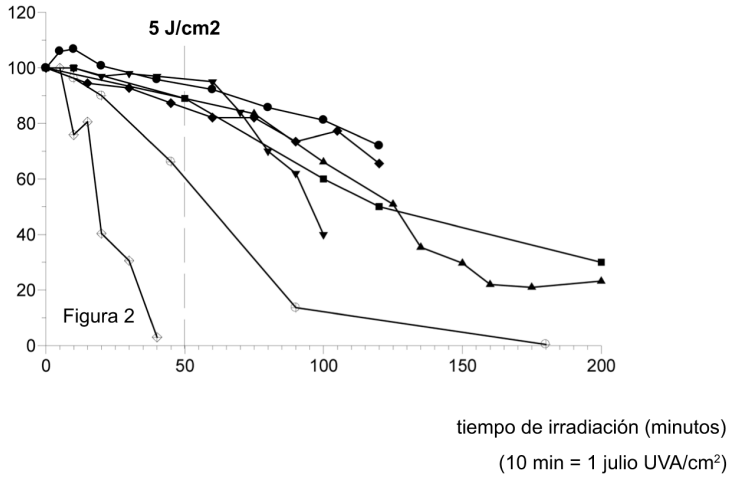
La figura 1 muestra un ejemplo de distribución aceptable de la irradiancia espectral de un simulador solar con filtro. Procede de la fuente de haluro metálico cebado utilizada en la prueba de validación del ensayo de fototoxicidad 3T3 ARN (6) (8) (17). Se indica el efecto de dos filtros distintos y el efecto filtrante adicional de la tapa de una placa de cultivo celular de 96 pocillos. El filtro H2 solo se ha utilizado con sistemas de ensayo que pueden tolerar una cantidad elevada de UVB (ensayo con modelo de piel y ensayo de fotohemólisis de eritrocitos). En el ensayo de fototoxicidad 3T3 ARN se utilizó el filtro H1. La figura muestra que el efecto filtrante adicional de la tapa de la placa se observa sobre todo en la banda de UVB, pero queda en el espectro de irradiación una cantidad suficiente de UVB para excitar sustancias que absorben normalmente en esta banda, como la amiodarona (véase el cuadro 1).

▼B

**Figura 2**

**Sensibilidad de las células Balb/c 3T3 ante la irradiación (medida en la banda UVA)**

Viabilidad de las células (porcentaje de la absorción de rojo neutro respecto a los controles mantenidos en la oscuridad)




(Véanse el punto 1.4.1.5.2, párrafo segundo, y los puntos 1.4.2.2.1 y 1.4.2.2.2)

Sensibilidad de las células Balb/c 3T3 ante la irradiación con el simulador solar utilizado en la prueba de validación del ensayo de fototoxicidad 3T3 ARN, medida en la banda UVA. La figura muestra los resultados obtenidos en siete laboratorios diferentes en el estudio de prevalidación (1). Las dos curvas con símbolos huecos se obtuvieron con células viejas (gran número de pases), que tuvieron que sustituirse por nuevas poblaciones celulares, mientras que las curvas con símbolos macizos corresponden a células con una tolerancia aceptable a la irradiación.

Con estos datos se determinó que la dosis máxima de irradiación no citotóxica es de 5 J/cm$^2$ (línea discontinua vertical). La línea discontinua horizontal muestra además el efecto aceptable máximo de irradiación contemplado en el punto 1.4.2.2.

▼M3

## B.42. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES

### INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE basados en ellas se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Ya se ha adoptado el método de ensayo (ME) original para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA, así como una revisión de los trabajos asociados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). El LLNA actualizado se basa en la evaluación de la experiencia y de los datos científicos (12). Este es el segundo ME que se diseña para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. El otro ME (es decir, el correspondiente a la TG 406 de la OCDE, capítulo B.6 del presente anexo) utiliza ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (13). El LLNA resulta más ventajoso que el método B.6 y la TG 406 de la OCDE (13) en cuanto al bienestar de los animales. El presente ME LLNA actualizado incluye un conjunto de normas de comportamiento (NC) (apéndice 1) que puede utilizarse para evaluar la situación de la validación de métodos de ensayo nuevos o modificados que sean similares, desde el punto de vista funcional y mecánico, al LLNA, de acuerdo con los principios del documento de orientación nº 34 de la OCDE (14).

2. El LLNA estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Ha de señalarse que los sensibilizantes suaves o moderados que se recomiendan como productos químicos adecuados para el control positivo (CP) en métodos de ensayo con cobayas (es decir, el B.6, TG 406 de la OCDE) (13), son también apropiados para utilizarse en el LLNA (6) (8) (15). En este ME se describe también la opción de un LLNA reducido (rLLNA), que podría suponer una reducción de hasta el 40 % del número de animales utilizados (16) (17) (18). El rLLNA puede utilizarse cuando sea necesario a efectos normativos confirmar una predicción negativa de potencial de sensibilización cutánea, siempre que se respeten todas las demás especificaciones del protocolo del LLNA, como se describe en el presente ME. La predicción de un resultado negativo debe efectuarse sobre la base de toda la información disponible según se describe en el punto 4. Antes de aplicar el rLLNA, debe aportarse una justificación clara y científicamente motivada de su uso. Si, contra lo esperado, se obtiene un resultado positivo o dudoso en el rLLNA, puede ser necesario efectuar más ensayos para interpretar o aclarar la observación. El rLLNA no debe utilizarse para identificar el peligro de sustancias problema que sean sensibilizantes cutáneos cuando se necesite información sobre la relación dosis-respuesta, tal como la subcategorización a efectos del Reglamento (CE) nº 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y del Sistema Globalmente Armonizado de las Naciones Unidas de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos.

### DEFINICIONES

3. En el apéndice 2 se dan las definiciones utilizadas.

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA constituye un método alternativo para identificar productos químicos que pueden ser sensibilizantes cutáneos. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA en lugar de los ensayos con cobayas (es decir, el B.6, TG 406 de la OCDE) (13), sino que, como su valor es equivalente, el LLNA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior. Antes de efectuar el estudio, el laboratorio de ensayo debe considerar toda la información disponible sobre

▼M3

la sustancia problema. Tal información ha de incluir la identidad y la estructura química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA es apropiado para cada sustancia problema (dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA; véase el punto 5) y de ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA es un método *in vivo*, por lo que no elimina el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. No obstante, puede reducir el número de animales necesarios para este fin. Además supone un refinamiento sustancial (menos dolor y molestias) de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto. El LLNA se basa en la consideración de fenómenos inmunológicos desencadenados por sustancias químicas durante la fase de inducción de la sensibilización. Al contrario que los ensayos que utilizan cobayas (es decir, los del capítulo B.6, TG 406 de la OCDE) (13), el LLNA no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. Tampoco exige el uso de coadyuvantes, como ocurre en el ensayo de maximización con cobayas (13). Por consiguiente, el LLNA reduce el dolor y las molestias para los animales. A pesar de las ventajas que supone con respecto al ensayo del capítulo B.6 y a la TG 406 de la OCDE, ha de reconocerse que hay ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar el capítulo B.6 o la TG 406 de la OCDE (13) (por ejemplo, los resultados falsos negativos que se producen en el LLNA con determinados metales, los falsos positivos con algunos irritantes cutáneos (como algunos productos químicos del tipo de los agentes tensioactivos) (19) (20), o la solubilidad de la sustancia problema). Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (21) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el B.6 o la TG 406 de la OCDE) (13). Por otra parte, según la limitada base de datos de la validación, que se refiere principalmente a formulaciones de plaguicidas, el LLNA tiene mayor probabilidad que el ensayo con cobayas de dar un resultado positivo con estos tipos de sustancias problema (22). Sin embargo, cuando se somete a ensayo una formulación, podría considerarse la inclusión de sustancias similares con resultados conocidos como sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el LLNA funciona correctamente (véase el punto 16). Dejando aparte estas limitaciones detectadas, el LLNA debería ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que haya propiedades asociadas a esta que puedan interferir con la exactitud del LLNA.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. El principio básico del LLNA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia problema. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser $\geq 3$ para que se pueda justificar la clasificación de la sustancia problema como posible sensibilizante cutáneo. Los procedimientos aquí descritos se basan en el uso de marcado radiactivo *in vivo* para medir el aumento del número de células en proliferación presentes en los ganglios linfáticos auriculares que drenan la zona. Sin embargo, pueden emplearse otros parámetros para evaluar el número de células en proliferación, siempre que se cumplan plenamente los requisitos de las normas de comportamiento (apéndice 1).

▼M3

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

**Selección de la especie animal**

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Se utilizan hembras adultas jóvenes de las cepas CBA/Ca o CBA/J, nulíparas y que no estén preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que no existen diferencias significativas específicas de la cepa o del sexo en la respuesta del LLNA.

**Alojamiento y alimentación**

8. Los ratones deben alojarse en grupos (23), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

**Preparación de los animales**

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

**Preparación de las soluciones administradas**

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

**Verificación de la fiabilidad**

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las autoridades competentes antes de efectuar el LLNA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar una respuesta positiva en el LLNA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del índice de estimulación > 3 con

▼M3

respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del CP debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un índice de estimulación > 20 sería excesivo). Los controles positivos preferidos son aldehído hexilcinámico (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v) y mercaptobenzotiazol (nº CAS 149-30-4) al 5 % en *N,N*-dimetilformamida (véase el apéndice 1, cuadro 1). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos ≤ 6 meses) del CP en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de controles positivos históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA mediante la obtención constante de resultados positivos con los controles positivos en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados sobre los controles positivos.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin CP en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con CP. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con CP periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con las sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con CP periódico aceptable y el estudio con CP periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un CP en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de CP en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (12).

15. Aunque el CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (24). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

16. En los casos en que se evalúen sustancias problema de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser también útil emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias problema. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

▼M3

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

**Número de animales y niveles de dosis**

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y del vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (3) y (5). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (3) (25). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (19), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias problema hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de la sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 35). Además, cuando se obtienen datos de cada uno de los animales, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP (12). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. Sin embargo, algunas autoridades normativas pueden considerar aceptables los datos de conjuntos de animales; en tales situaciones, los usuarios pueden elegir entre recoger datos de cada animal o de conjuntos de animales.

**Ensayo de cribado previo**

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

▼M3

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 6). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (25). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), y el día 6. Además, el día 6 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación cutánea local viene indicada por una puntuación de eritema $\geq 3$ o por un aumento del espesor de la oreja $\geq 25$ % cualquiera de los días de la medición (26) (27). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18), induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

*Cuadro 1*

**Puntuación del eritema**

| Observación | Puntuación |
|---|---|
| Sin eritema | 0 |
| Eritema muy leve (apenas perceptible) | 1 |
| Eritema bien definido | 2 |
| Eritema de moderado a intenso | 3 |
| Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema | 4 |

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (26) (27), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 %, estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (30) (32) (33) (34).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (35) (36) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 6, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva (37).

▼M3

**Calendario experimental del estudio principal**

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. En el dorso de cada oreja se aplican 25 µl de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2 y 3:* Se repite el procedimiento de aplicación del día 1.

— *Días 4 y 5:* Sin tratamiento.

— *Día 6:* Se toma nota del peso de cada animal. Se inyectan 250 µl de solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) estéril que contenga 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) de $^3$H-metil-timidina (tritiada) a todos los ratones (de evaluación y de control) a través de la vena de la cola. Otra posibilidad es inyectar 250 µL de PBS estéril con 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) de $^{125}$I-yododesoxiuridina y fluorodesoxiuridina $10^{-5}$ M a todos los ratones por la vena de la cola. Al cabo de cinco horas (5 h), se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se sumergen en PBS, poniendo juntos los de cada animal (enfoque por animales individuales); la otra posibilidad consiste en extirpar los ganglios linfáticos de cada oreja y sumergirlos en PBS, poniendo juntos los procedentes de cada grupo de tratamiento (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento). En la referencia (12) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

**Preparación de las suspensiones celulares**

26. Se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos (CGL) extraídos bilateralmente siguiendo el enfoque por animales individuales o, alternativamente, el de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, mediante disgregación mecánica suave a través de una malla de acero inoxidable de 200 µm de luz, u otra técnica aceptable que permita obtener una suspensión de células sueltas. Las suspensiones de CGL se lavan dos veces con un exceso de PBS y el ADN se precipita con ácido tricloroacético (ATC) al 5 %, a 4 °C durante 18 h (3). A continuación el sedimento se vuelve a suspender en 1 mL de ATC y se traslada a viales de centelleo con 10 mL de líquido de centelleo para el recuento de $^3$H, o se transfiere directamente a tubos de recuento γ para el recuento de $^{125}$I.

**Determinación de la proliferación celular (radiactividad incorporada)**

27. La incorporación de $^3$H-metil-timidina se mide con el contador de centelleo β, que cuenta las desintegraciones por minuto (DPM). La incorporación de $^{125}$I-yododesoxiuridina se mide por el recuento de $^{125}$I y también se expresa en DPM. Dependiendo del enfoque utilizado, la incorporación se expresará como DPM/ratón (enfoque por animales individuales) o DPM/grupo de tratamiento (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento).

**LLNA reducido**

28. En ciertas situaciones, cuando sea necesario a efectos normativos confirmar una predicción negativa de potencial de sensibilización cutánea, es posible utilizar un protocolo de LLNA reducido (rLLNA) (16) (17) (18) con menos animales, siempre que se respeten todas las demás especificaciones del protocolo del LLNA, como se describe en el presente ME. Antes de aplicar el rLLNA, debe aportarse una justificación clara y científicamente motivada de su uso. Si se obtiene un resultado positivo o dudoso en el rLLNA, puede ser necesario efectuar más ensayos para interpretar o aclarar la observación.

▼M3

29. La reducción del número de grupos de dosis es la única diferencia entre los protocolos del LLNA y del rLLNA, por lo que este rLLNA no proporciona información sobre la relación dosis-respuesta. En consecuencia, no debe utilizarse el rLLNA cuando se necesite obtener información sobre dicha relación. Como en el LLNA de dosis múltiples, la máxima concentración de la sustancia problema evaluada en el rLLNA debe ser la concentración máxima que no induzca en el ratón toxicidad sistémica manifiesta ni excesiva irritación cutánea local (véase el punto 18).

OBSERVACIONES

**Observaciones clínicas**

30. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (37).

**Pesos corporales**

31. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

32. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE. Si se emplea el enfoque por animales individuales, el IE se obtiene dividiendo la media de los valores de DPM de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema, y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores de DPM de los ratones del grupo de control del vehículo (CV) o disolvente. El IE medio del CV es entonces la unidad. Si se emplea el enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, el IE se obtiene dividiendo la incorporación de radiactividad del conjunto de cada grupo de tratamiento por la incorporación de radiactividad del conjunto del grupo de CV; así se obtiene un IE medio.

33. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es $\geq$ 3. Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos de disolvente o vehículo y de CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso se declara positivo (4) (5) (6).

34. Si fuera necesario aclarar los resultados obtenidos, se tendrán en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea local en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (7).

35. La recogida de datos de radiactividad de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos en cuanto a la presencia y el grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos de CV paralelos). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados «valores atípicos»).

▼M3

DATOS E INFORME

**Datos**

36. Se resumirán los datos en forma de cuadro. Si se emplea el enfoque por animales individuales, deben indicarse los valores de DPM de cada animal, la media de DPM/animal del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo de CV en paralelo. Si se emplea el enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento, ha de indicarse la media o la mediana del valor de DPM, y la media del IE de cada grupo de tratamiento, comparado con el grupo de CV en paralelo.

**Informe del ensayo**

37. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote],

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

▼M3

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— un cuadro con los valores de DPM y del IE de cada ratón (enfoque por animales individuales) o medios (enfoque de acumulación en conjuntos por grupo de tratamiento), correspondientes a cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores de DPM/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento, cuando se utilice el enfoque por animales individuales,

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos tratados con la sustancia problema como en los de control, cuando se utilice el enfoque por animales individuales,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165-169.

(3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13-31.

(4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563-79.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.

▼**M3**

(8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49-59.

(9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 258-273.

(10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34, 274-286.

(11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol*, 34: 249-257.

(12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(13) OCDE (1992), *Skin Sensitisation.* OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, París. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281-284.

(16) Kimber, I., Dearman, R.J., Betts, C.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Kern, P.S., Patlewicz, G.Y. and Basketter, D.A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181-185.

(17) Comité Científico Consultivo del CEVMA (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), Comisión Europea, Dirección General Centro Común de Investigación, Instituto de Sanidad y Protección de los Consumidores, Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos, april 2007. Disponible en la dirección: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf]

(18) ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(19) ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No. 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llna-rep.pdf]

▼**M3**

(20) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(21) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(22) ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/]

(23) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(24) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71-89.

(25) OCDE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 404, Paris, France. Disponible en la dirección: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Non-radiactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf]

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(35) OCDE (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(36) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(37) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼M3

*Apéndice 1*

**Normas de comportamiento para la evaluación de métodos de ensayo LLNA similares o modificados que se propongan para determinar la sensibilización cutánea**

INTRODUCCIÓN

1. El objetivo de las normas de comportamiento (NC) consiste en comunicar la base por la que puede determinarse si un nuevo método de ensayo, tanto protegido (es decir, sujeto a derechos de autor, patentado, registrado) como no protegido, presenta la suficiente exactitud y fiabilidad para determinados fines de ensayo. Estas normas de comportamiento, basadas en métodos de ensayo validados y aceptados, pueden utilizarse para evaluar la fiabilidad y la exactitud de otros métodos similares (conocidos como ensayos «de imitación») que se basan en principios científicos similares y miden o predicen el mismo efecto biológico o tóxico (14).

2. Antes de la adopción de métodos modificados (es decir, posibles mejoras propuestas para un método de ensayo aprobado), debe efectuarse una evaluación para determinar el efecto que tienen los cambios propuestos sobre el comportamiento del ensayo y el grado en que tales cambios afectan a la información disponible para los demás componentes del proceso de validación. En función del número y de la naturaleza de los cambios propuestos, de los datos generados y de la documentación justificativa de tales cambios, estos métodos deben someterse o bien al mismo proceso de validación descrito para un nuevo ensayo o bien, si procede, a una evaluación limitada de la fiabilidad y de la pertinencia utilizando normas de comportamiento establecidas (14).

3. Los métodos similares o modificados cuyo uso se proponga con arreglo al presente método de ensayo deben evaluarse para determinar su fiabilidad y exactitud utilizando sustancias representativas de toda la gama de resultados del LLNA. Para evitar el uso injustificado de animales, se recomienda insistentemente que los diseñadores de modelos consulten con las autoridades competentes antes de iniciar los estudios de validación de acuerdo con las normas de comportamiento y las orientaciones recogidas en el presente método de ensayo.

4. Estas normas de comportamiento se basan en las normas de comportamiento armonizadas del ICCVAM de EE. UU., del CEVMA de la Comisión Europea y del CVAM de Japón (12), para evaluar la validez de versiones similares o modificadas del LLNA. Las normas de comportamiento consisten en componentes fundamentales del método de ensayo, sustancias de referencia recomendadas y niveles de exactitud y fiabilidad que el método propuesto debe cumplir o superar.

I. **Componentes fundamentales del método de ensayo**

5. Para garantizar que un método de LLNA similar o modificado es análogo, desde el punto de vista funcional y mecánico, al LLNA y mide el mismo efecto biológico, deben incluirse en el protocolo del método de ensayo los siguientes componentes:

— la sustancia problema debe aplicarse tópicamente en ambas orejas del ratón,

— la proliferación de linfocitos debe medirse en los ganglios linfáticos que drenan la zona donde se aplica la sustancia problema,

— la proliferación de linfocitos debe medirse durante la fase de inducción de la sensibilización cutánea,

▼M3

— respecto a las sustancias problema, la dosis más alta seleccionada debe ser la concentración máxima que no induzca toxicidad sistémica ni excesiva irritación cutánea local en el ratón. Respecto a las sustancias de referencia positivas, la dosis más alta debe ser al menos tan elevada como los valores de CE3 de las correspondientes sustancias de referencia del LLNA (véase el cuadro 1) sin producir toxicidad sistémica ni excesiva irritación cutánea local en el ratón,

— en cada estudio debe incluirse un CV en paralelo y, cuando sea pertinente, también un CP en paralelo,

— debe utilizarse un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis,

— pueden recogerse datos de cada animal o bien de conjuntos de animales.

Si no se cumple alguno de estos criterios, no pueden utilizarse estas normas de comportamiento para la validación del método similar o modificado.

II. **Lista mínima de sustancias de referencia**

6. Las normas de comportamiento armonizadas del ICCVAM de EE. UU., del CEVMA de la Comisión Europea y del CVAM de Japón (12) señalan 18 sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse y otras cuatro optativas [es decir, sustancias que producen resultados falsos positivos o falsos negativos en el LLNA, cuando se comparan con los resultados obtenidos con seres humanos y cobayas (el B.6, o la TG 406 de la OCDE) (13), por lo que brindan la oportunidad de demostrar un comportamiento igual o mejor que el del LLNA] que están incluidas en las normas de comportamiento del LLNA. Los criterios de selección para escoger estas sustancias son los siguientes:

— la lista de sustancias de referencia representa los tipos de sustancias que se someten normalmente a ensayo para determinar el potencial de sensibilización cutánea y la gama de respuestas que el LLNA es capaz de medir o predecir,

— las sustancias tienen una estructura química bien definida,

— respecto a cada sustancia se dispone de datos de apoyo para el LLNA procedentes de ensayos con cobayas (es decir, el capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE) (13) y, en la medida de lo posible, de datos obtenidos con seres humanos,

— las sustancias pueden conseguirse fácilmente a través de un proveedor comercial.

En el cuadro 1 se recogen las sustancias de referencia recomendadas, que deben evaluarse en el vehículo con el que figuran en el cuadro 1. En caso de que no se disponga de una sustancia de la lista, pueden utilizarse otras sustancias que cumplan los criterios de selección mencionados, aportando la justificación correspondiente.

▼M3

*Cuadro 1*

**Sustancias de referencia recomendadas para las normas de comportamiento del LLNA**

| Número | Sustancias (1) | Nº CAS | Forma | Veh. (2) | CE3 % (3) | N (4) | 0,5 x – 2,0 x CE3 | Rango real CE3 | LLNA/cobayas | LLNA/seres humanos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 5-Cloro-2-metil-4-isotiazolin-3-ona (CMI) y 2-metil-4-isotiazolin-3-ona (MI) (5) | 26172-55-4/ 2682-20-4 | Líq. | DMF | 0,009 | 1 | 0,0045-0,018 | NC | +/+ | +/+ |
| 2 | DNCB | 97-00-7 | Sól. | AOO | 0,049 | 15 | 0,025-0,099 | 0,02-0,094 | +/+ | +/+ |
| 3 | 4-Fenilendiamina | 106-50-3 | Sól. | AOO | 0,11 | 6 | 0,055-0,22 | 0,07-0,16 | +/+ | +/+ |
| 4 | Cloruro de cobalto | 7646-79-9 | Sól. | DMSO | 0,6 | 2 | 0,3-1,2 | 0,4-0,8 | +/+ | +/+ |
| 5 | Isoeugenol | 97-54-1 | Líq. | AOO | 1,5 | 47 | 0,77-3,1 | 0,5-3,3 | +/+ | +/+ |
| 6 | 2-Mercaptobenzotiazol | 149-30-4 | Sól. | DMF | 1,7 | 1 | 0,85-3,4 | NC | +/+ | +/+ |
| 7 | Citral | 5392-40-5 | Líq. | AOO | 9,2 | 6 | 4,6-18,3 | 5,1-13 | +/+ | +/+ |
| 8 | AHC | 101-86-0 | Líq. | AOO | 9,7 | 21 | 4,8-19,5 | 4,4-14,7 | +/+ | +/+ |
| 9 | Eugenol | 97-53-0 | Líq. | AOO | 10,1 | 11 | 5,05-20,2 | 4,9-15 | +/+ | +/+ |
| 10 | Benzoato de fenilo | 93-99-2 | Sól. | AOO | 13,6 | 3 | 6,8-27,2 | 1,2-20 | +/+ | +/+ |
| 11 | Alcohol cinámico | 104-54-1 | Sól. | AOO | 21 | 1 | 10,5-42 | NC | +/+ | +/+ |
| 12 | Imidazolidinil-urea | 39236-46-9 | Sól. | DMF | 24 | 1 | 12-48 | NC | +/+ | +/+ |
| 13 | Metacrilato de metilo | 80-62-6 | Líq. | AOO | 90 | 1 | 45-100 | NC | +/+ | +/+ |
| 14 | Clorobenceno | 108-90-7 | Líq. | AOO | 25 | 1 | NA | NA | –/– | –/ (*) |
| 15 | Isopropanol | 67-63-0 | Líq. | AOO | 50 | 1 | NA | NA | –/– | –/+ |

▼M3

| Número | Sustancias ([1]) | Nº CAS | Forma | Veh. ([2]) | CE3 % ([3]) | N ([4]) | 0,5 x – 2,0 x CE3 | Rango real CE3 | LLNA/cobayas | LLNA/seres humanos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 16 | Ácido láctico | 50-21-5 | Líq. | DMSO | 25 | 1 | NA | NA | –/– | –/ (*) |
| 17 | Salicilato de metilo | 119-36-8 | Líq. | AOO | 20 | 9 | NA | NA | –/– | –/– |
| 18 | Ácido salicílico | 69-72-7 | Sól. | AOO | 25 | 1 | NA | NA | –/– | –/– |
| Sustancias optativas para demostrar un comportamiento mejorado respecto al LLNA | | | | | | | | | | |
| 19 | Laurilsulfato de sodio | 151-21-3 | Sól. | DMF | 8,1 | 5 | 4,05-16,2 | 1,5-17,1 | +/– | +/– |
| 20 | Dimetacrilato de etilenglicol | 97-90-5 | Líq. | MEK | 28 | 1 | 14-56 | NC | +/– | +/+ |
| 21 | Xileno | 1330-20-7 | Líq. | AOO | 95,8 | 1 | 47,9-100 | NC | +/ (**) | +/– |
| 22 | Cloruro de níquel | 7718-54-9 | Sól. | DMSO | 5 | 2 | NA | NA | –/+ | –/+ |

Abreviaturas: AOO = Acetona: aceite de oliva (4:1, v/v); nº CAS = número del Chemical Abstracts Service; DMF = *N,N*-dimetilformamida; DMSO = dimetilsulfóxido; DNCB = 2,4-dinitroclorobenceno; CE3 = concentración estimada que se considera necesaria para producir un índice de estimulación de 3; cobayas = resultado del ensayo con cobayas (es decir, el B. 6 o TG 406 de la OCDE) (13); AHC = aldehído hexilcinámico; Líq. = líquido; LLNA = resultado del ensayo con ganglios linfáticos locales de múrido (es decir, el B. 42 o TG 429 de la OCDE) (1); MEK = metil-etil-cetona; NA = no aplicable por ser el índice de estimulación < 3; NC = no calculado al haberse obtenido los datos de un solo estudio; Sól. = sólido; Veh. = vehículo del ensayo.

(*) Se supone que no es sensibilizante en seres humanos, ya que no se han encontrado resultados clínicos de la prueba del parche, no está incluido en el juego de alérgenos de la prueba del parche y tampoco se han encontrado informes de casos de sensibilización en seres humanos.

(**) No se dispone de datos de ensayos con cobayas.

([1]) Las sustancias deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

([2]) Debido al posible efecto del uso de vehículos diferentes sobre el comportamiento del LLNA, debe utilizarse el vehículo recomendado para cada sustancia de referencia (24) (32).

([3]) El valor medio si se dispone de más de un valor de CE3. En caso de sustancias negativas (es decir, con un índice de estimulación < 3), se proporcionará la concentración de ensayo más elevada.

([4]) Número de estudios de LLNA de los que se han obtenido datos.

([5]) Disponible comercialmente como Kathon CG (nº CAS 55965-84-9), que es una mezcla 3:1 de CMI y MI. Las concentraciones relativas de cada componente varían del 1,1 % al 1,25 % (CMI) y del 0,3 % al 0,45 % (MI). Los componentes inactivos son sales de magnesio (del 21,5 % al 24 %) y nitrato de cobre (del 0,15 % al 0,17 %), y el resto de la formulación consiste en agua, entre el 74 % y el 77 %. Puede adquirirse fácilmente Kathon CG a través de Sigma-Aldrich y Rohm and Haas (actualmente, Dow Chemical Corporation).

▼**M3**

III. **Niveles definidos de fiabilidad y exactitud**

7. La exactitud de un método de LLNA similar o modificado debe ser al menos igual a la de las normas de comportamiento del LLNA cuando se evalúa con las 18 sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse. El método nuevo o modificado debe llevar a una clasificación correcta basada en una decisión de tipo «sí/no». Sin embargo, es posible que el método nuevo o modificado no clasifique correctamente todas las sustancias de referencia mínimas que deben utilizarse. Si, por ejemplo, queda mal clasificado uno de los sensibilizantes débiles, podría tenerse en cuenta, a efectos de demostración de la equivalencia de comportamiento, una justificación de la clasificación errónea y la aportación de datos adicionales (por ejemplo, resultados del ensayo que proporcionen clasificaciones correctas de otras sustancias con propiedades físicas, químicas y sensibilizantes similares a las de la sustancia de referencia mal clasificada). En tales circunstancias, la situación de la validación del método de ensayo LLNA nuevo o modificado podría evaluarse caso por caso.

*Reproducibilidad intralaboratorios*

8. Para determinar la reproducibilidad intralaboratorios de un método de LLNA nuevo o modificado, hay que utilizar una sustancia sensibilizante que esté bien caracterizada en el LLNA. Por tanto, las normas de comportamiento del LLNA se basan en la variabilidad de los resultados obtenidos con el aldehído hexilcinámico (AHC) en ensayos repetidos. Para evaluar la fiabilidad intralaboratorios, deben obtenerse valores de concentración estimada umbral (CEu) del AHC en cuatro ocasiones distintas, con un intervalo de al menos una semana entre los ensayos. Una reproducibilidad intralaboratorios aceptable viene indicada por la capacidad del laboratorio de obtener, en cada ensayo con AHC, unos valores de CEu entre el 5 % y el 20 %, que representan un rango de 0,5-2,0 veces el valor medio de CE3 especificado para el AHC (10 %) en el LLNA (véase el cuadro 1).

*Reproducibilidad interlaboratorios*

9. Para determinar la reproducibilidad interlaboratorios de un método de LLNA nuevo o modificado, hay que utilizar dos sustancias sensibilizantes que estén bien caracterizadas en el LLNA. Las normas de comportamiento del LLNA se basan en la variabilidad de los resultados obtenidos con el AHC y el 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) en ensayos realizados en diferentes laboratorios. Los valores de CEu deben obtenerse independientemente a partir de un solo estudio llevado a cabo en al menos tres laboratorios distintos. Para demostrar que la reproducibilidad interlaboratorios es aceptable, cada laboratorio debe obtener unos valores de CEu del 5 % al 20 % con el AHC y del 0,025 % al 0,1 % con el DNCB, que representan un rango de 0,5-2,0 veces el valor medio de CE3 especificado para el AHC (10 %) y el DNCB (0,05 %), respectivamente, en el LLNA (véase el cuadro 1).

▼**M3**

*Apéndice 2*

**Definiciones**

*Exactitud:* Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (14).

*Sustancia de evaluación comparativa:* Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características fisicoquímicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

*Concentración estimada umbral (CEu):* Concentración estimada de una sustancia problema que se necesita para conseguir un índice de estimulación indicativo de una respuesta positiva.

*Concentración estimada tres (CE3):* Concentración estimada de una sustancia problema que se necesita para conseguir un índice de estimulación de tres.

*Falso negativo:* Sustancia problema identificada incorrectamente como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa.

*Falso positivo:* Sustancia problema identificada incorrectamente como positiva o activa por un método de ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva.

*Peligro:* Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición.

*Reproducibilidad interlaboratorios:* Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias problema, pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (14).

*Reproducibilidad intralaboratorios:* Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (14).

*Ensayo de imitación:* Denominación de un método de ensayo que es estructural y funcionalmente similar a un método de ensayo de referencia, validado y aceptado. Tales métodos de ensayo serían candidatos para una validación de actualización. También se pueden denominar métodos de ensayo similares (14).

*Valor atípico:* Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

*Normas de comportamiento:* Normas, basadas en un método de ensayo validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto, que es similar desde el punto de vista funcional y mecánico. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo, ii) una lista mínima de sustancias de referencia seleccionadas de entre las sustancias utilizadas para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado, y iii) los niveles similares de exactitud y fiabilidad que, sobre la base de lo obtenido con el método de ensayo validado, debe mostrar el método de ensayo propuesto cuando se evalúa con la lista mínima de sustancias de referencia (14).

*Método de ensayo protegido:* Método de ensayo cuyos elementos tienen la fabricación y distribución restringida por patentes, derechos de autor, marcas registradas, etc.

▼**M3**

*Garantía de calidad:* Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

*Sustancias de referencia:* Sustancias seleccionadas para utilizarse en el proceso de validación, cuyas respuestas en el sistema de ensayo de referencia *in vitro* o *in vivo* o en la especie de interés ya se conocen. Estas sustancias deben ser representativas de las clases de sustancias con las que esté previsto utilizar el método de ensayo, y deben representar toda la gama de respuestas que puede esperarse de las sustancias con las que pueda utilizarse, desde fuertes hasta débiles e incluso negativas. Es posible que se necesiten distintos conjuntos de sustancias de referencia para las diferentes fases del proceso de validación y para los distintos métodos de ensayo y usos de los ensayos (14).

*Pertinencia:* Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (14).

*Fiabilidad:* Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (14).

*Sensibilización cutánea:* Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

*Índice de estimulación (IE):* Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

*Sustancia problema (o producto químico problema):* Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

*Método de ensayo validado:* Método de ensayo sobre el cual se han completado los estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con respecto a un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (14).

▼B

B.43. **ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD EN ROEDORES**

1. **MÉTODO**

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 424 (1997).

Este método de ensayo tiene por objeto obtener la información necesaria para confirmar o caracterizar de manera más precisa la posible neurotoxicidad de sustancias químicas en animales adultos. Puede combinarse con los actuales métodos de ensayo de los estudios de toxicidad por administración continuada o bien realizarse como estudio independiente. Se recomienda consultar el documento orientativo de la OCDE sobre estrategias y métodos de ensayo de neurotoxicidad (1) *(OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods),* que puede servir de ayuda para la concepción de estudios basados en este método de ensayo. Esta consulta es especialmente importante cuando se recomienden modificaciones de las observaciones y procedimientos de ensayo para el uso habitual del presente método. El documento orientativo se ha preparado a fin de facilitar la selección de otros procedimientos de ensayo que puedan emplearse en determinadas circunstancias.

En el presente método no se trata la evaluación de la neurotoxicidad para el desarrollo.

1.1. INTRODUCCIÓN

En la evaluación de las características tóxicas de las sustancias químicas, es importante considerar el potencial de efectos neurotóxicos. El método de ensayo de toxicidad sistémica por administración continuada incluye ya observaciones para detectar la posible neurotoxicidad. El presente método de ensayo puede utilizarse para preparar un estudio destinado a obtener más información sobre los efectos neurotóxicos observados en los estudios de toxicidad sistémica por administración continuada o para confirmar tales efectos. Sin embargo, según la valoración que se haga de la posible neurotoxicidad de ciertas clases de sustancia químicas puede considerarse más conveniente evaluarlas mediante este método sin indicación previa de la posible neurotoxicidad a partir de estudios de toxicidad sistémica por administración continuada. Entre los aspectos que deben tenerse en cuenta para ello pueden citarse los siguientes:

— observación de signos neurológicos o lesiones neuropatológicas en estudios de toxicidad distintos de los estudios de toxicidad sistémica por administración continuada, o

— relación estructural u otro tipo de información que los relacione con neurotóxicos conocidos.

Además puede haber otros casos en los que sea adecuado utilizar este método de ensayo, para más información véase (1).

El presente método se ha concebido de manera que pueda ajustarse a distintas necesidades concretas a la hora de confirmar la neurotoxicidad histopatológica y comportamental de una sustancia, y de aportar una caracterización y cuantificación de las respuestas neurotóxicas.

▼B

Anteriormente, la neurotoxicidad se equiparaba a la neuropatía que implicaba lesiones neuropatológicas o disfunciones neurológicas, como convulsiones, parálisis o temblores. Aunque la neuropatía es una manifestación importante de la neurotoxicidad, actualmente se sabe que hay muchos otros signos que indican toxicidad en el sistema nervioso (por ejemplo, pérdida de coordinación motora, deficiencias sensoriales y disfunciones del aprendizaje y la memoria) y que pueden no aparecer en estudios de neuropatía o en otros tipos de estudios.

El presente método de ensayo de neurotoxicidad está pensado para detectar efectos neuropatológicos y neurocomportamentales en roedores adultos. Aunque los efectos en el comportamiento, incluso en ausencia de cambios morfológicos, pueden dar cuenta de un impacto nocivo en el organismo, no todas las alteraciones del comportamiento están relacionadas con el sistema nervioso. Por lo tanto, cualquier cambio observado tiene que evaluarse junto con datos correlativos de tipo bioquímico, hematológico e histopatológico, y con datos sobre otros tipos de toxicidad sistémica. Las pruebas prescritas en este método para obtener la caracterización y cuantificación de las respuestas neurotóxicas incluyen procedimientos comportamentales e histopatológicos que pueden ir apoyados de manera complementaria por investigaciones bioquímicas y/o electrofisiológicas (1) (2) (3) (4).

Los neurotóxicos pueden actuar sobre un número de dianas dentro del sistema nervioso y mediante una gran variedad de mecanismos. Dado que no hay ningún conjunto de ensayos que, por sí solo, sea capaz de evaluar perfectamente el potencial neurotóxico de todas las sustancias, puede ser necesario utilizar otros ensayos *in vivo* o *in vitro* aplicables concretamente al tipo de neurotoxicidad observada o prevista.

Este método de ensayo puede aplicarse también junto con las orientaciones establecidas en el documento de la OCDE denominado *OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods* (1) a fin de preparar estudios destinados a caracterizar de manera más precisa la cuantificación dosis-respuesta o a aumentar la sensibilidad de esta, de manera que pueda estimarse más exactamente un nivel sin efectos adversos observados o comprobar peligros sospechados o conocidos de la sustancia. Por ejemplo, pueden prepararse estudios para determinar y evaluar los mecanismos neurotóxicos o para complementar los datos ya disponibles a partir de los procedimientos básicos de observación neuropatológica y neurocomportamental. No es necesario que estos estudios generen de nuevo datos que se obtendrían también a partir de los procedimientos estándar recomendados en el presente método, si estos datos ya son conocidos y no se consideran necesarios para la interpretación de los resultados del estudio.

Este estudio de neurotoxicidad, cuando se realiza solo o en combinación con otros, aporta información que puede:

— determinar si el sistema nervioso está afectado de manera permanente o reversible por la sustancia ensayada;

— contribuir a la caracterización de las alteraciones del sistema nervioso relacionadas con la exposición a la sustancia y a la comprensión de los mecanismos que intervienen;

▼B

— determinar las relaciones entre dosis y tiempo de respuesta a fin de estimar un nivel sin efectos adversos observados (que pueda utilizarse con objeto de establecer criterios de seguridad para la sustancia).

En este método de ensayo se administra la sustancia estudiada por vía oral. Otras vías de administración (por ejemplo, por vía dérmica o por inhalación) pueden resultar más adecuadas y requerir modificaciones de los procedimientos recomendados. La elección de la vía de administración depende del perfil de exposición humana y de la información cinética y toxicológica disponible.

1.2. DEFINICIONES

**Efecto adverso:** toda alteración respecto a una situación de referencia, relacionada con el tratamiento, que disminuya la capacidad del organismo para sobrevivir, reproducirse o adaptarse al entorno.

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo administrada. Se expresa en peso (g, mg), en peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (por ejemplo, mg/kg) o en concentración constante en la dieta (ppm).

**Posología:** término general que abarca la dosis administrada, su frecuencia y duración.

**Neurotoxicidad:** alteración adversa de la estructura o función del sistema nervioso debida a la exposición a un agente físico, biológico o químico.

**Neurotóxico:** cualquier agente físico, biológico o químico que pueda provocar neurotoxicidad.

**NOAEL:** sigla inglesa referente a la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se administra por vía oral una serie de dosis de la sustancia a varios grupos de roedores de laboratorio. Normalmente se requiere una administración continuada y el período de administración puede ser 28 días, 90 días (toxicidad subcrónica) o 1 año o más (toxicidad crónica). Los procedimientos establecidos en este método de ensayo pueden aplicarse también a un estudio de neurotoxicidad aguda. Los animales se someten a ensayo para detectar anomalías neurológicas o del comportamiento o para caracterizarlas. Durante cada período de observación se evalúa una gama de comportamientos que podría estar afectada por neurotóxicos. Al final del ensayo, se hace una perfusión *in situ* a un subgrupo de animales de cada sexo y de cada grupo, y se preparan y examinan secciones de los nervios periféricos y de la médula espinal y el cerebro.

Cuando se trate de un estudio único independiente destinado a detectar neurotoxicidad o a caracterizar los efectos neurotóxicos, los animales de cada grupo no empleados para perfusión y posterior histopatología (véase el cuadro 1) pueden utilizarse para otros procedimientos concretos de tipo electrofisiológico, neuroquímico, neuropatológico o neurocomportamental que puedan complementar los datos obtenidos a partir de los exámenes estándar prescritos en el presente método (1). Estos procedimientos complementarios pueden ser especialmente útiles cuando las observaciones empíricas o los efectos previstos indiquen un tipo determinado o una diana de neurotoxicidad química. Otra posibilidad es utilizar los animales restantes para evaluaciones como las prescritas en los métodos de ensayo para estudios de toxicidad por administración continuada en roedores.

▼B

Cuando los procedimientos del presente método de ensayo se combinen con los de otros métodos, se necesita un número suficiente de animales para que puedan cumplirse todos los requisitos de las observaciones de ambos estudios.

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Selección de la especie animal**

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque pueden utilizarse otras especies de roedores. Deben usarse animales adultos jóvenes y sanos de cepas utilizadas habitualmente en laboratorio. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. La administración ha de empezar lo antes posible tras el destete, preferiblemente, antes de que los animales tengan 6 semanas de edad y, en cualquier caso, antes de que tengan 9 semanas. No obstante, cuando este estudio se combine con otros, podrían tener que ajustarse estos requisitos de edad. Al principio del estudio, la diferencia de peso entre los animales empleados no debe superar el ± 20 % del peso medio de cada sexo. Cuando se realice un estudio de la toxicidad oral por administración continuada como fase previa de un estudio de toxicidad a largo plazo, deben utilizarse en ambos estudios animales procedentes de la misma cepa y del mismo origen.

1.4.2. **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 $^{o}$C (± 3 $^{o}$C). Aunque la humedad relativa ha de ser, como mínimo, del 30 % y preferiblemente no superior al 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplicará una iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Debe mantenerse al mínimo el ruido fuerte intermitente. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua a voluntad. Si la sustancia de ensayo se administra con los alimentos, es preciso obtener una mezcla adecuada, lo cual puede influir en la elección de la dieta. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo.

1.4.3. **Preparación de los animales**

Se eligen al azar animales jóvenes y sanos y se reparten en los lotes testigo y tratado. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la posición de las mismas sean mínimos. Los animales se identifican individualmente y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes del inicio del ensayo, a fin de permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

1.4.4. **Vía de administración y preparación de las dosis**

En este método de ensayo se administra la sustancia estudiada por vía oral. La administración de la sustancia por vía oral puede hacerse mediante una sonda, la dieta, el agua o cápsulas. Pueden usarse otras vías de administración (por ejemplo: cutánea o inhalación) pero en este caso pueden tener que modificarse los procedimientos recomendados. La elección de la vía de administración depende del perfil de exposición humana y de la información cinética y toxicológica disponible. Deberá justificarse adecuadamente la elección de la vía de administración, así como las consiguientes modificaciones de los procedimientos del método de ensayo.

▼B

En caso necesario, la sustancia estudiada se disolverá o suspenderá en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible solución o suspensión en otros vehículos. Las características tóxicas del vehículo deben ser conocidas. Además, deben valorarse las siguientes características del vehículo: efectos en la absorción, la distribución, el metabolismo o la retención de la sustancia estudiada que puedan alterar sus características tóxicas; y efectos en el consumo de alimentos y agua o en el estado nutricional de los animales.

1.5. PROCEDIMIENTOS

1.5.1. **Número y sexo de los animales**

Cuando se trate de un estudio único independiente, se utilizarán al menos 20 animales (10 hembras y 10 machos) en cada grupo tratado y de control para la evaluación de las observaciones clínicas y funcionales, que deben ser detalladas. Como mínimo 5 machos y 5 hembras, seleccionados entre estos 10 machos y 10 hembras, deben ser perfundidos *in situ* y utilizados para hacer una histopatología detallada al final del estudio. En los casos en que solo se observe un número limitado de animales en un grupo determinado para detectar efectos neurotóxicos, se considerará la inclusión de estos animales entre los seleccionados para perfusión. Cuando el estudio se lleve a cabo en combinación con un estudio de toxicidad por administración continuada, deberá usarse un número adecuado de animales para que puedan alcanzarse los objetivos de ambos estudios. En el cuadro 1 se da el número mínimo de animales por grupo para varias combinaciones de estudios. Si van a sacrificarse animales durante el experimento o están previstos grupos para observar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de efectos tóxicos con posterioridad al tratamiento, o cuando se plantee la realización de observaciones complementarias, habrá de aumentarse el número de animales para asegurar que se dispone de los animales necesarios para observación e histopatología.

1.5.2. **Lote tratado y lote testigo**

Deben utilizarse, al menos, tres grupos para tratamiento y uno para control. No obstante, si, a partir de la evaluación de otros datos, no son previsibles efectos a una dosis continuada de 1 000 mg/kg de peso corporal, podrá realizarse un ensayo límite. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio para ayudar a determinar la gama de dosis que debe emplearse. A excepción de la administración de la sustancia de ensayo, los animales del lote testigo deben ser tratados de la misma manera que los de los lotes de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia de ensayo, el lote testigo recibirá el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.

1.5.3. **Control de fiabilidad**

El laboratorio que lleve a cabo el estudio debe presentar datos que demuestren su capacidad de realizarlo y la sensibilidad de los procedimientos que emplee. Tales datos han de acreditar su capacidad de detectar y cuantificar, en su caso, los cambios en los diferentes parámetros cuya observación se recomienda, como signos neurovegetativos, reactividad sensorial, fuerza de prensión y actividad motriz. En la bibliografía (referencias 2 a 29) puede encontrarse información sobre sustancias que causan diferentes tipos de respuestas neurotóxicas y que pueden usarse para controles positivos. Pueden utilizarse datos de referencia anteriores si se mantienen los aspectos esenciales de los procedimientos experimentales. Se recomienda la actualización periódica de los datos de referencia anteriores. Deben obtenerse nuevos datos que demuestren que los procedimientos mantienen la sensibilidad requerida cuando el laboratorio haya modificado alguno de los aspectos esenciales del ensayo o los procedimientos.

▼B

1.5.4. **Selección de la dosis**

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la toxicidad previamente observada y los datos cinéticos y de toxicidad disponibles referentes a la sustancia de ensayo o productos afines. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos neurotóxicos o efectos tóxicos sistémicos evidentes. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar cualquier posible relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados con la dosis inferior. En principio, las dosis deben fijarse de manera que los efectos tóxicos primarios en el sistema nervioso puedan distinguirse de los relacionados con la toxicidad sistémica. Los intervalos del doble al triple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto lote de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis. Si se dispone de una estimación razonable sobre la exposición del hombre, esta deberá también tenerse en cuenta.

1.5.5 **Ensayo límite**

Si en un estudio con una dosis de, al menos, 1 000 mg/kg de peso corporal/día, siguiendo el procedimiento descrito, no se produce ningún efecto neurotóxico observable y si, a la luz de los datos de sustancias estructuralmente afines, no cabe esperar efectos tóxicos, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con 3 dosis. Según el grado previsto de exposición humana, puede ser preciso administrar una dosis oral superior en el ensayo límite. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas de la sustancia de ensayo las que determinan el grado máximo de exposición que puede alcanzarse. Para la realización de un estudio de toxicidad oral aguda, la dosis de un ensayo límite debe ser, al menos, 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Administración de las dosis**

Las dosis de sustancia se administran a los animales todos y cada uno de los días del período de 28; es necesario justificar la aplicación de una posología de solo 5 días por semana o un período de exposición más corto. Si la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal. El volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal; no obstante, en el caso de las soluciones acuosas puede considerarse la posibilidad de administrar 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de sustancias irritantes o corrosivas, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo en todas las dosis.

Si la sustancia se administra con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia de ensayo administradas no interfieren la nutrición normal ni el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia de ensayo se administre con los alimentos, puede utilizarse una concentración constante en la dieta (en ppm) o bien una dosis constante en relación con el peso corporal de los animales; debe precisarse el método escogido. Si la sustancia se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a la misma hora y ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en relación con el peso corporal del animal. Cuando se utilice un estudio de administración continuada como fase previa de un estudio a largo plazo, deberá utilizarse en ambos estudios una dieta similar. Para estudios de toxicidad aguda, si no es posible utilizar una dosis única, podrá administrarse la sustancia en fracciones menores a lo largo de un período que no excederá de 24 horas.

▼B

1.6. OBSERVACIONES

1.6.1. **Frecuencia de las observaciones y ensayos**

En los estudios de administración continuada, el período de observación debe cubrir todo el período de administración. En los estudios de toxicidad aguda, debe haber un período de observación de 14 días posterior al tratamiento. En el caso de los animales de grupos satélite que se mantengan sin exposición durante el período posterior al tratamiento, las observaciones deben cubrir también este período.

Las observaciones deben hacerse con la frecuencia suficiente para que sea máxima la probabilidad de detección de cualquier anomalía neurológica o del comportamiento. Las observaciones deben hacerse preferiblemente a las mismas horas cada día prestando atención al período más agudo de los efectos previstos tras la administración. En el cuadro 2 se resume la frecuencia de las observaciones clínicas y las pruebas funcionales. Si, a partir de estudios anteriores, se dispone de datos cinéticos o de otro tipo que muestren la necesidad de utilizar tiempos diferentes para las observaciones, pruebas o períodos post-observación, se aplicará otro programa a fin de conseguir el máximo de información. Los cambios en el programa habrán de justificarse debidamente.

1.6.1.1. *Observaciones del estado general de salud y de la mortalidad/morbilidad*

Deberán observarse cuidadosamente todos los animales al menos una vez al día para comprobar su estado de salud y al menos dos veces al día para comprobar la mortalidad y la morbilidad.

1.6.1.2. *Observaciones clínicas detalladas*

Se someterán a observación clínica detallada todos los animales seleccionados con este fin (véase el cuadro 1) una vez antes de la primera exposición (para poder hacer comparaciones con un mismo sujeto) y después a diferentes intervalos según la duración del estudio (véase el cuadro 2). Deberán hacerse observaciones clínicas detalladas sobre lotes satélite de recuperación al final del período de recuperación. Las observaciones clínicas detalladas se harán fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y se registrarán cuidadosamente utilizando sistemas de puntuación que incluyan criterios o escalas de puntuación para cada medición de las observaciones. Los criterios o escalas deberán ser definidos explícitamente por el laboratorio que lleve a cabo el ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas (no relacionadas sistemáticamente con el tratamiento) y que las observaciones sean realizadas por observadores especializados ajenos al tratamiento.

Se recomienda que las observaciones se hagan de manera estructurada aplicando sistemáticamente criterios bien definidos (incluida la definición del «intervalo» normal) a cada animal en cada momento de observación. El «intervalo normal» deberá documentarse adecuadamente. Se registrarán todos los signos observados. Siempre que sea factible, se registrará también la magnitud de los signos observados. Las observaciones clínicas deben incluir, entre otras cosas, los cambios de la piel, pelo, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, así como respiración por la boca, cualquier signo de orina o defecación y orina descolorida).

▼B

También habrá de anotarse cualquier respuesta no habitual en lo que se refiere a la posición del cuerpo, el nivel de actividad (por ejemplo, aumento o disminución de la exploración del ambiente normal en el que se mueva) y la coordinación de los movimientos. Deben registrarse también los cambios observados en la marcha (por ejemplo, contoneo o ataxia), postura (por ejemplo, espalda encorvada) y respuesta a la manipulación, la colocación u otros estímulos ambientales, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, convulsiones o temblores, estereotipos (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, movimientos anómalos de la cabeza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anómalos (por ejemplo, lamido excesivo o mordiscos, automutilación, marcha hacia atrás y vocalización) o agresión.

1.6.1.3. *Pruebas funcionales*

De manera semejante a las observaciones clínicas detalladas, deben efectuarse también pruebas funcionales una vez antes de la exposición y frecuentemente a continuación en todos los animales seleccionados con este fin (véase el cuadro 1). La frecuencia de estas pruebas depende también de la duración del estudio (véase el cuadro 2). Además de los períodos de observación establecidos en el cuadro 2, se llevarán a cabo observaciones funcionales de lotes satélite de recuperación lo más cercanas que sea posible al sacrificio final. Las pruebas funcionales deben incluir la reactividad sensorial frente a estímulos de diferentes tipos [por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos (5) (6) (7)], y la evaluación de la fuerza de prensión (8) y de la actividad motriz (9). La actividad motriz se medirá con un dispositivo automático capaz de detectar tanto aumentos como disminuciones de actividad. Si se usa otro sistema definido, este deberá ser cuantitativo y su sensibilidad y fiabilidad deberán demostrarse. Se probará cada dispositivo para asegurar la fiabilidad a lo largo del tiempo y la concordancia entre diferentes dispositivos. En las referencias respectivas se da más información sobre los procedimientos que pueden seguirse. Si no hay datos (por ejemplo, relaciones estructura-actividad, datos epidemiológicos, otros estudios toxicológicos...) que indiquen los posibles efectos neurotóxicos, debe considerarse la inclusión de pruebas más especializadas de funciones sensoriales o motrices o del aprendizaje y la memoria, para estudiar estos posibles efectos más detalladamente. En (1) se da más información sobre pruebas más especializadas y su aplicación.

Excepcionalmente, puede omitirse la prueba a animales que muestren signos de toxicidad en un grado tal que interfiera de manera significativa la prueba funcional. La eliminación de animales de cualquier prueba funcional se justificará debidamente.

1.6.2. **Peso corporal y consumo de alimento y agua**

Para estudios de hasta 90 días de duración, tienen que pesarse todos los animales al menos una vez por semana y deben hacerse mediciones del consumo de alimentos (consumo de agua, cuando la sustancia estudiada se administre por este medio) al menos semanalmente. Para estudios a largo plazo, deben pesarse todos los animales al menos una vez por semana durante las primeras 13 semanas y al menos una vez cada 4 semanas a continuación. Se medirá el consumo de alimentos (consumo de agua, cuando la sustancia estudiada se administre por este medio) al menos semanalmente durante las primeras 13 semanas y luego a intervalos de unos 3 meses, a menos que el estado de salud o el peso corporal aconsejen otra cosa.

▼B

1.6.3. **Oftalmología**

Para estudios de más de 28 días de duración, debe realizarse una exploración oftalmológica con un oftalmoscopio o equipo equivalente adecuado antes de administrar la sustancia de ensayo y al término del estudio, preferiblemente, de todos los animales, y al menos del lote con la dosis más alta y del lote de control. Si se observan cambios oculares o si los signos clínicos lo exigen, deben examinarse todos los demás animales. Para estudios a largo plazo, debe efectuarse una exploración oftalmológica a las 13 semanas. Las exploraciones oftalmológicas no serán necesarias si se conocen ya estos datos a partir de otros estudios de duración parecida y a dosis semejantes.

1.6.4. **Hematología y bioquímica clínica**

Cuando el estudio de neurotoxicidad se haga en combinación con un estudio de toxicidad sistémica por administración continuada, se practicarán exámenes hematológicos y determinaciones bioquímicas clínicas según lo indicado en el respectivo método del estudio de toxicidad sistémica. La recogida de muestras debe hacerse de tal manera que se reduzcan al mínimo los posibles efectos en el neurocomportamiento.

1.6.5. **Histopatología**

Los análisis neuropatológicos tienen que estar pensados de manera que complementen y amplíen las observaciones efectuadas durante la fase *in vivo* del estudio. Se fijarán *in situ* tejidos de, al menos, 5 animales por sexo y por grupo (véase el cuadro 1 y el parágrafo siguiente), utilizando técnicas de fijación y perfusión ampliamente reconocidas (véase la referencia 3 del capítulo 5 y la referencia 4 del capítulo 50). Deben registrarse todas las modificaciones macroscópicas observables. Cuando se trate de un estudio único independiente destinado a detectar neurotoxicidad o a caracterizar efectos neurotóxicos, el resto de los animales puede utilizarse o bien para otros procedimientos concretos de tipo electrofisiológico (10) (11) (16) (17), neuroquímico (10) (11) (14) (15), neuropatológico (10) (11) (12) (13) o neurocomportamental (10) (11) que puedan complementar los procedimientos y análisis descritos aquí o bien para aumentar el número de sujetos examinados para detectar histopatologías. Estos procedimientos complementarios pueden ser especialmente útiles cuando las observaciones empíricas o los efectos previstos indiquen un tipo determinado o una diana de neurotoxicidad (2) (3). Otra posibilidad es utilizar el resto de los animales para las evaluaciones patólogicas habituales descritas en el método sobre estudios de toxicidad por administración continuada.

Se aplicará un procedimiento general de tinción, como hematoxilina-eosina, en todas las muestras de tejido incluidas en parafina y se hará un examen microscópico. Cuando se observen o se sospechen signos de neuropatía periférica, deberán examinarse muestras incluidas en plástico de tejido de nervios periféricos. Según los signos clínicos que aparezcan podrán examinarse otros tejidos o utilizarse procedimientos de tinción especiales. En (3) y (4) se dan orientaciones sobre otros tejidos que pueden examinarse. Pueden ser útiles también (18) otros colorantes especiales para demostrar determinados tipos de alteraciones patológicas.

▼B

Se someterán a examen histológico secciones representativas de los sistemas nerviosos central y periférico (véase la referencia 3 del capítulo 5 y la referencia 4 del capítulo 50). Las zonas examinadas tienen que incluir normalmente: el prosencéfalo, el centro del cerebro, incluida una sección del hipocampo, el mesencéfalo, el cerebelo, la protuberancia anular, el bulbo raquídeo, el ojo con el nervio óptico y la retina, la médula espinal en los engrosamientos cervical y lumbar, los ganglios de la raíz dorsal, las fibras de la raíz ventral y dorsal, el nervio ciático en su parte próxima (en la rodilla) y el nervio tibial en sus ramificaciones del músculo de la pantorrilla. Las secciones de la médula espinal y de los nervios periféricos tienen que incluir tanto una sección transversal como una longitudinal. Debe prestarse atención a la vasculatura del sistema nervioso. Se examinará también una muestra de músculo esquelético, especialmente del de la pantorrilla. Hay que prestar especial atención a las zonas de los sistemas nerviosos central y periférico con estructura celular y fibrosa que se sabe que resultan particularmente afectadas por neurotóxicos.

En las referencias (3) y (4) se dan orientaciones sobre las alteraciones neuropatológicas que derivan normalmente de la exposición a sustancias tóxicas. Se recomienda un examen por fases de las muestras de tejido empezando por una comparación de las secciones del lote de dosis alta con las del lote testigo. Si no se observan alteraciones neuropatológicas en las muestras de estos lotes, no se requieren más análisis. Si se observan alteraciones neuropatológicas en el lote de dosis alta, deben codificarse y examinarse secuencialmente muestras de cada uno de los tejidos posiblemente afectados pertenecientes a los lotes de dosis intermedia y baja.

Si en el examen cualitativo se encuentran pruebas de alteraciones neuropatológicas, se realizará otro examen en todas las regiones del sistema nervioso que muestren estas alteraciones. Deberán codificarse y examinarse al azar, sin conocimiento del código, secciones de todos los lotes de cada una de las regiones posiblemente afectadas. Debe registrarse la frecuencia y gravedad de cada lesión. Después de que todos los lotes hayan sido clasificados, puede revelarse el código y entonces pueden hacerse análisis estadísticos para evaluar relaciones dosis-respuesta. Deberán darse ejemplos que muestren diferentes niveles de gravedad de cada lesión.

Los resultados neuropatológicos tienen que evaluarse en el contexto de observaciones y mediciones del comportamiento, así como en relación con otros datos de estudios de toxicidad sistémica de la sustancia anteriores y realizados al mismo tiempo.

## 2. RESULTADOS

### 2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Deben proporcionarse datos de cada animal. Además, tienen que resumirse todos los datos en un cuadro que recoja, para cada lote de ensayo o testigo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o sacrificio, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de los signos observados, con inclusión del momento de su aparición, la duración y la gravedad de los efectos tóxicos, el número de animales que presenten lesiones, y el tipo y la gravedad de las lesiones.

▼B

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados del estudio deben evaluarse en lo que se refiere a la incidencia, gravedad y correlación de los efectos neurocomportamentales y neuropatológicos (así como a los efectos electrofisiológicos y neuroquímicos si se incluyen exámenes complementarios) y a cualquier otro efecto adverso observado. Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y de amplia aceptación. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio.

3. **INFORME**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

Sustancia estudiada:

— naturaleza física (incluyendo isomerismo, pureza y propiedades fisicoquímicas);

— identificación química.

Vehículo (si procede):

— motivación de la elección del vehículo.

Animales sometidos a ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia, condiciones de alojamiento, aclimatación, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

— datos sobre la formulación de la sustancia de ensayo o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado,

— especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado,

— datos de la administración de la sustancia de ensayo,

— justificación de la selección de la dosis;

— justificación de la vía y la duración de la exposición,

— factor de conversión de la concentración (ppm) de la sustancia de ensayo en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede,

— datos de la calidad de los alimentos y el agua.

Procedimientos de observación y prueba:

— información detallada sobre la asignación de los animales de cada grupo a los subgrupos de perfusión,

— información detallada sobre los sistemas de puntuación, incluyendo criterios y escalas de puntuación para cada medición dentro de las observaciones clínicas detalladas,

▼B

— información detallada sobre las pruebas funcionales de reactividad sensorial a estímulos de diferentes tipos (por ejemplo, auditivos, visuales y propioceptivos); para la evaluación de la fuerza de prensión; para la evaluación de la actividad motriz (incluida información detallada sobre dispositivos automáticos para la detección de actividad); y otros procedimientos empleados,

— información detallada acerca de los exámenes oftalmológicos y, en su caso, los exámenes hematológicos y las pruebas bioquímicas clínicas con valores de referencia pertinentes,

— información detallada sobre procedimientos neurocomportamentales, neuropatológicos, neuroquímicos o electrofisiológicos.

Resultados:

— peso corporal/cambios en el peso corporal, incluyendo peso corporal en el momento del sacrificio,

— consumo de alimentos y de agua, en su caso,

— datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad y mortalidad,

— naturaleza, gravedad y duración (momento de aparición y evolución posterior) de las observaciones clínicas detalladas (reversibles o no),

— descripción pormenorizada de todos los resultados de las pruebas funcionales,

— resultados de la autopsia,

— descripción detallada de todos los resultados neurocomportamentales, neuropatológicos y neuroquímicos o electrofisiológicos, si se conocen,

— datos sobre la absorción, si los hay,

— tratamiento estadístico de los resultados, cuando convenga.

Discusión de los resultados

— información sobre la respuesta a la dosis,

— relación entre otros efectos tóxicos y la conclusión acerca del potencial neurotóxico de la sustancia de ensayo,

— nivel sin efectos adversos observados.

Conclusiones

— se considera conveniente una declaración concreta sobre la neurotoxicidad general de la sustancia estudiada.

4. **REFERENCIAS**

1. OEDC Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OCDE, Paris. In preparation.

2. Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

3. World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principies and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

4. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B


5. Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999-1003.

6. Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9,691-704.

7. Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267-283.

8. Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233-236.

9. Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599-609.

10. Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

11. Chang, L.W., ed. (1995). Principies of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

12. Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689-695.

13. Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.ToxicoL, 18, 343-352.

14. O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445-452.

15. O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368-378.

16. Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299-335.

17. Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726-742.

18. Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, europathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

*Cuadro 1*

**Número mínimo de animales por grupo cuando el estudio de neurotoxicidad se realiza por separado o en combinación con otros estudios**

| | ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Como estudio aparte | Combinado con el estudio de 28 días | Combinado con el estudio de 90 días | Combinado con el estudio de toxicidad crónica |
| Número total de animales por lote | 10 machos y 10 hembras | 10 machos y 10 hembras | 15 machos y 15 hembras | 25 machos y 25 hembras |
| Número de animales seleccionados para pruebas funcionales incluidas observaciones clínicas detalladas | 10 machos y 10 hembras | 10 machos y 10 hembras | 10 machos y 10 hembras | 10 machos y 10 hembras |
| Número de animales seleccionados para perfusión *in situ y* neurohistopatología | 5 machos y 5 hembras | 5 machos y 5 hembras | 5 machos y 5 hembras | 5 machos y 5 hembras |
| Número de animales seleccionados para observaciones de toxicidad por administración continuada/subcrónica/crónica, hematología, bioquímica clínica, histopatología, etc., según lo indicado en las respectivas *Orientaciones.* | | 5 machos y 5 hembras | 10 machos ([1]) y 10 hembras ([1]) | 20 machos ([1]) y 20 hembras ([1]) |
| Observaciones complementarias, según corresponda | 5 machos y 5 hembras | | | |

([1]) Incluye 5 animales seleccionados para pruebas funcionales y observaciones clínicas detalladas dentro del estudio de neurotoxicidad.

▼B

*Cuadro 2*

**Frecuencia de las observaciones y pruebas funcionales**

| Tipo de observaciones | | Duración del estudio | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | T. aguda | 28 días | 90 días | T. crónica |
| En todos los animales | Estado general de salud | diariamente | diariamente | diariamente | diariamente |
| | Mortalidad/morbilidad | dos veces al día | dos veces al día | dos veces al día | dos veces al día |
| En animales seleccionados para observaciones funcionales | Observaciones clínicas detalladas | — antes de la primera exposición<br>— dentro de las 8 horas siguientes a la administración en el momento estimado del efecto más agudo<br>— el día 7 y 14 después de la administración | — antes de la primera exposición<br>— una vez por semana a continuación | — antes de la primera exposición<br>— una vez durante la primera o segunda semana de exposición<br>— mensualmente a continuación | — antes de la primera exposición<br>— una vez al final del primer mes de exposición<br>— cada 3 meses a continuación |
| | Pruebas funcionales | — antes de la primera exposición<br>— dentro de las 8 horas siguientes a la administración en el momento estimado del efecto más agudo<br>— el día 7 y 14 después de la administración | — antes de la primera exposición<br>— durante la cuarta semana de tratamiento tan cerca como sea posible del final del período de exposición | — antes de la primera exposición<br>— una vez durante la primera o segunda semana de exposición<br>— mensualmente a continuación | — antes de la primera exposición<br>— una vez al final del primer mes de exposición<br>— cada 3 meses a continuación |

▼B

## B.44. ABSORCIÓN CUTÁNEA: MÉTODO *IN VIVO*

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 427 (2004).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La exposición a muchas sustancias se produce principalmente a través de la piel, pero en la mayoría de los estudios toxicológicos efectuados con animales de laboratorio se utiliza la administración por vía oral. El estudio de absorción cutánea *in vivo* que se recoge en las presentes directrices permite la extrapolación a partir de los estudios orales cuando se efectúa la evaluación de la seguridad tras una exposición dérmica.

Antes de llegar a la circulación, las sustancias deben atravesar muchas capas de células de la piel. Para la mayoría de las sustancias, la capa que limita la tasa de esa incorporación es la capa córnea, formada por células muertas. La permeabilidad a través de la piel depende no solo de la lipofilia de la sustancia y del espesor de la capa exterior de la epidermis, sino también de otros factores, como el peso molecular y la concentración de la sustancia. En general, la piel de ratas y conejos es más permeable que la humana, mientras que la permeabilidad cutánea de cobayas y monos es más parecida a la nuestra.

Los métodos para medir la absorción cutánea pueden clasificarse en dos categorías: *in vivo* e *in vitro.* Los métodos *in vivo* pueden proporcionar buena información sobre la absorción cutánea de varias especies de laboratorio. Más recientemente se han elaborado métodos *in vitro.* Estos utilizan el transporte a través de piel humana o animal, con un espesor bien íntegro o bien parcial, hasta un depósito de líquidos. En otro método aparte (1) se describe el ensayo *in vitro.* Se recomienda consultar el documento orientativo de la OCDE sobre realización de estudios de absorción cutánea (2) para seleccionar el método más adecuado en cada situación, ya que en él se da más información sobre la idoneidad de los métodos tanto *in vivo* como *in vitro.*

El método *in vivo,* descrito en el presente texto, permite la determinación de la penetración de la sustancia problema a través de la piel hasta el compartimento sistémico. La técnica se utiliza ampliamente desde hace muchos años (3) (4) (5) (6) (7). Aunque en muchos casos pueden ser adecuados los estudios *in vitro* de absorción a través de la piel, es posible que haya situaciones en las que solo se puedan obtener los datos necesarios mediante estudios *in vivo.*

Las ventajas del método *in vivo* radican en que utiliza un sistema fisiológica y metabólicamente intacto, recurre a una especie común a muchos estudios de toxicidad y puede modificarse para utilizarlo con otras especies. Sus desventajas consisten en el uso de animales vivos, en la necesidad de utilizar sustancias radiomarcadas para conseguir unos resultados fiables, en las dificultades para determinar la fase de absorción precoz y en las diferencias de permeabilidad de la especie preferida (rata) respecto a la piel humana. La piel animal suele ser más permeable y, por tanto, puede llevar a una sobreestimación de la absorción a través de la piel humana (6) (8) (9). No deben ensayarse con animales vivos las sustancias cáusticas o corrosivas.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

**Dosis no absorbida:** la dosis lavada de la superficie cutánea tras la exposición y la presente en las protecciones no oclusivas, incluida la que se haya visto que se volatiliza de la piel durante la exposición.

**Dosis absorbida *(in vivo):*** la dosis presente en la orina, líquidos de lavado de la jaula, heces, aire espirado (si se mide), sangre, tejidos (si se recogen) y el resto del cuerpo, tras la eliminación de la piel correspondiente al lugar de aplicación.

**Dosis absorbible:** la dosis presente en la superficie o en el interior de la piel tras el lavado.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

La sustancia problema, preferentemente radiomarcada, se aplica a la piel esquilada de los animales, a una o más dosis apropiadas, en forma de preparado representativo en uso. Se deja el preparado problema en contacto con la piel durante un plazo fijo bajo una protección adecuada (no oclusiva, semioclusiva u oclusiva) para evitar la ingestión del preparado. Al final del plazo de exposición, se quita la protección y se limpia la piel con un agente adecuado (tanto la protección como el material de lavado se conservan para su análisis), y se aplica otra protección. Los animales están alojados antes, durante y después del plazo de exposición en jaulas de metabolismo individuales y las excretas y el aire espirado en estos periodos se recogen para su análisis. Puede omitirse la recogida del aire espirado si se dispone de información suficiente sobre la ausencia o poca importancia de la formación de metabolitos radiactivos volátiles. En cada estudio participan normalmente varios grupos de animales que se exponen al preparado problema. Un grupo se sacrifica al final del período de exposición. Otros grupos se sacrifican posteriormente a intervalos programados (2). Al final del tiempo de muestreo se sacrifican los animales restantes, se recoge su sangre para analizarla, se extrae la piel de los lugares de aplicación para su análisis y se analiza también el resto del cuerpo para buscar las posibles sustancias no excretadas. Se efectúa la determinación de las muestras con los medios adecuados y se calcula el grado de absorción a través de la piel (6) (8) (9).

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.4.1. **Selección de la especie animal**

La rata es la especie más utilizada, pero también pueden emplearse cepas y especies sin pelo que presenten unas tasas de absorción cutánea más parecidas a las del hombre (3) (6) (7) (8) (9). Deben emplearse animales adultos jóvenes, con buena salud, de un solo sexo (en principio, machos) de cepas de laboratorio utilizadas normalmente. Al empezar el estudio, la variación del peso de los animales utilizados no debe superar el ± 20 % del peso medio. Por ejemplo, son adecuadas las ratas machos de 200 g–250 g, especialmente de la mitad superior de esta banda.

▼B

1.4.2. **Número y sexo de los animales**

Para cada preparado problema y cada tiempo programado de sacrificio debe utilizarse un grupo de al menos 4 animales del mismo sexo. Cada grupo de animales se sacrificará tras un plazo diferente, por ejemplo al final del plazo de exposición (normalmente 6 o 24 horas) y en momentos posteriores (por ejemplo, 48 y 72 horas). Si se dispone de datos que demuestren la existencia de diferencias importantes en cuanto a la toxicidad dérmica entre machos y hembras, se elegirá el sexo más sensible. En ausencia de tales datos, puede utilizarse cualquiera de los sexos.

1.4.3. **Alojamiento y alimentación**

El cuarto de animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 $^{o}$C (± 3 $^{o}$C). Aunque la humedad relativa ha de ser, como mínimo, del 30 % y preferentemente no superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio; la cantidad no debe estar limitada, y tampoco el suministro de agua potable. Durante el estudio y, de preferencia, también durante la fase de aclimatación, los animales se alojarán en jaulas de metabolismo individuales. Como el vertido de agua y piensos puede afectar a los resultados, debe reducirse al mínimo la probabilidad de que ocurra.

1.4.4. **Preparación de los animales**

Los animales se marcan para identificarlos individualmente y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días antes del inicio del estudio, a fin de permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio.

Tras la fase de aclimatación, y unas 24 horas antes de la administración de la sustancia, se esquila una zona de piel de los hombros y del dorso de cada animal. Las propiedades de permeabilidad de la piel lesionada son diferentes de las de la piel intacta, por lo que debe procurarse no excoriar la piel. Una vez efectuado el esquileo y unas 24 horas antes de la aplicación de la sustancia problema a la piel (véase el punto 1.4.7), la superficie cutánea debe limpiarse con acetona para eliminar el sebo cutáneo. No se recomienda limpiar con agua y jabón porque un eventual resto de jabón podría aumentar la absorción de la sustancia problema. La superficie debe ser lo bastante grande para permitir un cálculo fiable de la cantidad absorbida de sustancia problema por centímetro cuadrado de piel, por lo que, de preferencia, ha de tener un mínimo de 10 $cm^2$. Esta superficie puede conseguirse con ratas de 200-250 g de peso corporal. Tras esta preparación, los animales se devuelven a las jaulas de metabolismo.

1.4.5. **Sustancia problema**

La sustancia problema es aquella cuyas características de penetración se van a estudiar. Lo mejor es que la sustancia problema esté radiomarcada.

1.4.6. **Preparación de las pruebas**

El preparado de la sustancia problema (por ejemplo, material puro, diluido o formulado que contiene la sustancia problema y que se aplica a la piel) debe ser el mismo (o un análogo realista) que aquel al que pueda verse expuesto el hombre u otra posible especie diana. Deben justificarse las eventuales desviaciones respecto al preparado «en uso». En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. En caso de que el vehículo sea distinto al agua, deben conocerse sus características de absorción y su posible interacción con la sustancia problema.

▼B

1.4.7. **Aplicación a la piel**

Se delimita en la piel el lugar de aplicación, con una superficie específica. Después se aplica de forma homogénea en ese lugar una cantidad conocida del preparado problema. Esta cantidad debe reflejar en principio la posible exposición humana, normalmente de 1 a 5 $mg/cm^2$ en caso de preparado sólido o hasta 10 $\mu l/cm^2$ en caso de líquidos. Si se emplean otras cantidades, hay que justificarlo en función de las condiciones previstas de uso, de los objetivos del estudio o de las características físicas del preparado problema. Tras la aplicación, hay que proteger el sitio tratado para que el animal no se lo frote. En la figura 1 se muestra un ejemplo de dispositivo clásico. Normalmente, el lugar de aplicación ha de llevar una protección no oclusiva (por ejemplo, una gasa de nailon permeable). Sin embargo, si la dosis es muy grande hay que ocluir el lugar de aplicación. En caso de que la evaporación de sustancias problema semivolátiles reduzca la tasa de recuperación de la sustancia problema hasta extremos inaceptables (véase también el párrafo primero del punto 1.4.10), será necesario recoger la sustancia evaporada en un filtro de carbón activo que recubra el dispositivo de aplicación (véase la figura 1). Es importante que los eventuales dispositivos no lesionen la piel, ni absorban el preparado problema ni reaccionen con él. Los animales se devuelven a sus jaulas de metabolismo individuales para recoger las excretas.

1.4.8. **Duración de la exposición y toma de muestras**

La duración de la exposición es el plazo entre la aplicación y la eliminación del preparado problema mediante lavado de la piel. El plazo de exposición debe tener una duración apropiada (normalmente 6 o 24 horas), según la duración prevista de la exposición humana. Tras la exposición, los animales se mantienen en las jaulas de metabolismo hasta el momento previsto para su sacrificio. De forma periódica a lo largo de toda la duración del estudio, hay que observar si los animales presentan signos de toxicidad o reacciones anormales. Al final de la exposición, hay que ver si la piel tratada presenta signos visibles de irritación.

Las jaulas de metabolismo deben permitir la recogida aparte de la orina y las heces a lo largo de todo el estudio. También deben permitir la recogida de dióxido de carbono $^{14}C$ y de compuestos volátiles de carbono $^{14}C$, que deben analizarse si se producen en gran cantidad (> 5 %). La orina, las heces y los fluidos recogidos (por ejemplo, dióxido de carbono $^{14}C$ y compuestos volátiles de carbono $^{14}C$) deben tomarse por separado de cada grupo y en cada momento de muestreo. Si se sabe con suficiente seguridad que la formación de metabolitos radiactivos volátiles es nula o muy limitada, pueden utilizarse jaulas abiertas.

Las excretas se recogen durante la exposición, hasta 24 horas tras el contacto inicial con la piel, y después cada día hasta el final del experimento. Aunque en principio es suficiente con tres intervalos de recogida de excretas, la finalidad prevista del preparado problema o los eventuales datos cinéticos pueden indicar la necesidad de utilizar intervalos adicionales o más adecuados para el estudio.

Al final de la exposición se retira el dispositivo protector de cada animal, y se conserva aparte para su análisis. La piel tratada de todos los animales debe lavarse al menos tres veces con un agente de limpieza, utilizando hisopos adecuados. Debe procurarse no contaminar otras partes del cuerpo. El agente de limpieza debe ser representativo de la práctica higiénica normal; por ejemplo, puede consistir en una solución acuosa de jabón. Por último, hay que secar la piel. Todos los hisopos y líquidos de lavado se guardan para su análisis. Antes de devolver los animales a sus jaulas individuales, se les aplica una protección nueva en el lugar del tratamiento, en caso de que formen parte de grupos que se vayan a estudiar posteriormente.

▼B

1.4.9. **Procedimiento final**

Los distintos animales de cada grupo se sacrificarán en el momento previsto y se recogerá su sangre para analizarla. El apósito o dispositivo protector se recogerá para su análisis. De cada animal se tomará la piel del lugar de aplicación y una superficie similar de piel esquilada que no haya recibido la sustancia, y se analizarán por separado. El lugar de aplicación podrá fraccionarse para separar la capa córnea de la epidermis subyacente, a fin de obtener más información sobre la distribución de la sustancia. La determinación de esta distribución a lo largo del tiempo tras la exposición debe indicar el destino de cualquier sustancia problema en la capa córnea. Para facilitar el fraccionamiento de la piel (tras el lavado final de esta y el sacrificio del animal), se retirarán todos los dispositivos protectores. Se extirpará de la rata la piel del lugar de aplicación, con una banda anular de piel adyacente, y se sujetará en un tablero con alfileres. Con una presión suave se aplicará a la superficie de la piel un trozo de cinta adhesiva, que se retirará junto con parte de la capa córnea. Se aplicarán trozos sucesivos de cinta hasta que esta deje de adherirse a la superficie de la piel, momento en que se habrá retirado la totalidad de la capa córnea. Todos los trozos de cinta procedentes de un mismo animal podrán reunirse en un solo envase al que se añadirá un agente para digerir tejidos, a fin de solubilizar la capa córnea. Los posibles tejidos diana se podrán recoger para someterlos a mediciones aparte antes de proceder a la determinación de la dosis absorbida en el cuerpo restante. Se conservarán los cuerpos de los distintos animales para su análisis. Normalmente será suficiente realizar el análisis del contenido total. Los órganos diana se podrán recoger para someterlos a análisis aparte (si así lo indican otros estudios). La orina presente en la vejiga en el momento del sacrificio programado se añadirá a la orina recogida previamente. Tras la recogida de las excretas de las jaulas de metabolismo en el momento del sacrificio programado, las jaulas y los colectores se lavarán con un disolvente adecuado. El resto del material que pueda estar contaminado se analizará análogamente.

1.4.10. **Análisis**

En todos los estudios debe conseguirse una recuperación adecuada (es decir, una media del 100 ± 10 % de la radiactividad). Deberán justificarse los casos en que la recuperación no esté en dicha banda. La cantidad de la dosis administrada presente en cada muestra se analizará mediante métodos validados adecuadamente.

El estudio estadístico debe incluir una medida de la varianza entre las réplicas de cada aplicación.

2. **DATOS**

Deben hacerse las siguientes mediciones con cada animal, en cada tiempo de muestreo, respecto a la sustancia problema y sus metabolitos (además de los datos individuales, deben comunicarse en forma de media los datos agrupados por tiempos de muestreo):

— cantidad relativa a los dispositivos protectores,

— cantidad que puede extraerse de la piel,

— cantidad en el interior o en la superficie de la piel que no puede retirarse mediante lavado,

▼B

— cantidad en la sangre de la muestra,

— cantidad en las excretas y en el aire espirado (en su caso),

— cantidad restante en el cuerpo y en los eventuales órganos tomados para su análisis aparte.

La cantidad de sustancia problema y sus metabolitos presente en las excretas, aire espirado, sangre y cuerpo permitirá la determinación de la cantidad total absorbida en cada intervalo. También puede calcularse la cantidad de sustancia problema absorbida por centímetro cuadrado de piel expuesta a la sustancia problema a lo largo del tiempo de exposición.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir los requisitos establecidos en el protocolo, con una justificación del sistema de ensayo utilizado y con los datos siguientes:

Sustancia de ensayo:

— datos de identificación [por ejemplo, número CAS, si se conoce; origen; pureza (pureza radioquímica); impurezas conocidas; número de lote],

— naturaleza física, propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, pH, volatilidad, solubilidad, estabilidad, peso molecular y log $P_{ow}$).

Preparado problema:

— formulación y justificación del uso,

— datos del preparado problema, cantidad aplicada, concentración conseguida, vehículo, estabilidad y homogeneidad.

Animales de ensayo:

— especie y cepa utilizadas,

— número, edad y sexo de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.,

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

Condiciones de ensayo:

— datos de la administración del preparado problema (lugar de la aplicación, métodos de determinación, oclusión/no oclusión, volumen, extracción, detección),

— datos de la calidad de los alimentos y del agua.

Resultados:

— eventuales signos de toxicidad,

— cuadros de datos de absorción (expresados en tasa, cantidad o porcentaje),

▼B

— porcentaje de recuperación total del experimento,

— interpretación de los resultados, comparación con otros datos eventualmente disponibles sobre la absorción de la sustancia problema a través de la piel.

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

1. Método de ensayo B.45. Absorción cutánea: método *in vitro*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

4. Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829-835.

5. Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA.

6. EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

7. EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

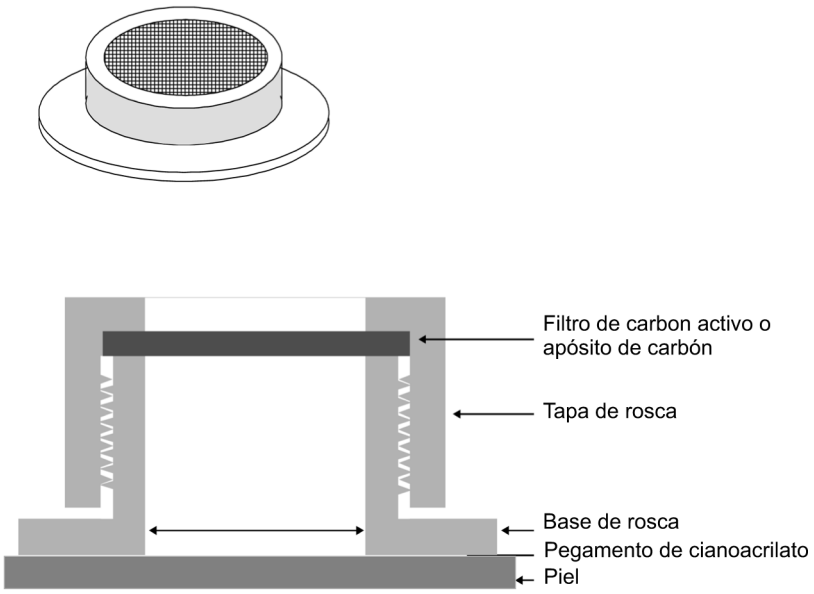
8. Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369-373.

9. Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399-404.

▼B

*Figura 1*

**Ejemplo de diseño de dispositivo clásico utilizado para definir y proteger el lugar de aplicación dérmica en los estudios *in vivo* de absorción a través de la piel**



▼B

B.45. **ABSORCIÓN CUTÁNEA: MÉTODO *IN VITRO***

1. **MÉTODO**

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 428 (2004).

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del presente método es proporcionar información sobre la absorción de una sustancia problema aplicada a la piel extirpada. Puede combinarse con el método *in vivo* del ensayo de absorción cutánea (1) o realizarse independientemente. Se recomienda consultar el documento orientativo de la OCDE sobre realización de estudios de absorción cutánea (2), que puede servir de ayuda para la concepción de estudios basados en este método de ensayo. El documento orientativo se ha preparado para facilitar la selección de los procedimientos *in vitro* adecuados según las distintas circunstancias, a fin de garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos con este método.

Los métodos para medir la absorción cutánea y la transferencia dérmica pueden clasificarse en dos categorías: *in vivo* e *in vitro*. Los métodos *in vivo* están bien comprobados y proporcionan información farmacocinética con una serie de especies animales. En otro método aparte (1) se describe un ensayo *in vivo*. Se lleva muchos años utilizando también métodos *in vitro* para medir la absorción cutánea. Aunque no se han efectuado estudios oficiales de validación de los ensayos *in vitro* correspondientes al presente método de ensayo, los expertos de la OCDE consideraron en 1999 que se disponía de suficientes datos evaluados para apoyar el método *in vitro* (3). En el documento orientativo (2) se incluye más información que avala este apoyo, con inclusión de un número significativo de comparaciones directas de métodos *in vitro* e *in vivo*. Hay una serie de monografías que examinan este aspecto y proporcionan datos pormenorizados sobre el uso de un método *in vitro* (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Los métodos *in vitro* miden la difusión de sustancias a la piel y, a través de esta, hasta un depósito de líquidos, y pueden utilizar piel muerta para medir solo la difusión, o piel reciente, activa metabólicamente, para medir simultáneamente la difusión y el metabolismo cutáneo. Tales métodos se utilizan particularmente en el cribado para comparar la transferencia de sustancias a la piel y a través de esta desde distintas formulaciones, y también pueden proporcionar modelos útiles para la evaluación de la absorción a través de la piel humana.

Es posible que el método *in vitro* no se pueda aplicar a todas las situaciones ni a todas las clases de sustancias. Quizá se pueda utilizar el método de ensayo *in vitro* para una evaluación cualitativa inicial de la penetración cutánea. En algunos casos puede ser necesario completarla con datos *in vivo*. Debe consultarse el documento orientativo (2) para considerar las situaciones en que pueda ser adecuado el método *in vitro*. En (3) se encuentra más información detallada para avalar la decisión.

El presente método presenta los principios generales para medir la absorción cutánea y la transferencia de una sustancia problema utilizando piel extirpada. Puede utilizarse piel procedente de muchas especies de mamíferos, incluido el hombre. Las propiedades de permeabilidad de la piel se mantienen tras su extirpación del cuerpo porque la principal barrera contra la difusión es la capa córnea, formada por células muertas, ya que no se ha encontrado transporte activo de sustancias a través de la piel. Se ha visto que la piel es capaz de metabolizar ciertas sustancias durante la absorción a través de ella (6), pero este proceso no es limitante en cuanto a la tasa de la dosis absorbida realmente, aunque puede afectar a la naturaleza de la sustancia que llega a la corriente sanguínea.

▼B

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

**dosis no absorbida** la dosis lavada de la superficie cutánea tras la exposición y la presente en las protecciones no oclusivas, además de la que se haya visto que se volatiliza de la piel durante la exposición;

**dosis absorbida** ***(in vitro)*** la masa de sustancia problema que llega al líquido receptor o a la circulación sistémica dentro de un plazo especificado;

**dosis absorbible** ***(in vitro)*** la dosis presente en la superficie o en el interior de la piel tras el lavado.

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

La sustancia problema, que puede estar radiomarcada, se aplica a la superficie de una muestra de piel que separa las dos cámaras de una célula de difusión. La sustancia permanece sobre la piel durante un tiempo dado, en condiciones determinadas, antes de eliminarse mediante un procedimiento adecuado de limpieza. Se toman muestras del líquido receptor a ciertos intervalos a lo largo del experimento y se determina su contenido en sustancia problema y metabolitos de esta.

Cuando se utilizan sistemas metabólicamente activos, pueden analizarse con métodos adecuados los metabolitos de la sustancia problema. Al final del experimento se cuantifica la distribución de la sustancia problema y sus metabolitos, en su caso.

Aplicando las condiciones adecuadas, descritas en este método y en el documento orientativo (2), se mide la absorción de la sustancia problema durante un plazo determinado mediante el análisis del líquido receptor y de la piel tratada. La sustancia problema que permanece en la piel debe considerarse absorbida, salvo que se demuestre que la absorción se puede determinar a partir de solo los valores del líquido receptor. El análisis de los otros componentes (material extraído de la piel por lavado y material restante dentro de las capas de la piel) permite una evaluación de los datos más avanzada, con inclusión de la distribución de toda la sustancia problema y el porcentaje de recuperación.

Para demostrar la eficacia y fiabilidad del sistema de ensayo en el laboratorio que lo aplique, debe disponerse de los resultados correspondientes a sustancias de referencia apropiadas, los cuales deben concordar con los publicados en la bibliografía en relación con el método utilizado. Este requisito puede cumplirse sometiendo a ensayo una sustancia de referencia apropiada (de preferencia con una lipofilia similar a la de la sustancia problema) en paralelo con esta, o bien presentando datos previos adecuados sobre una serie de sustancias de referencia de lipofilia diferente (por ejemplo, cafeína, ácido benzoico y testosterona).

1.4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.4.1. **Célula de difusión**

Una célula de difusión consiste en una cámara donadora y una cámara receptora, entre las que se coloca la piel (en la figura 1 se muestra un ejemplo de disposición normal). La célula debe quedar bien cerrada alrededor de la piel, permitir con facilidad la toma de muestras y la mezcla adecuada de la solución receptora en contacto con la parte inferior de la piel, así como un buen control de la temperatura de la célula y de su contenido. Son válidas tanto las células de difusión estática como las de difusión dinámica. En principio, las cámaras donadoras se dejan sin ocluir durante la exposición a una dosis pequeña de un preparado problema. Sin embargo, con las aplicaciones de grandes dosis, y en ciertos casos de pequeñas dosis, es posible que las cámaras donadoras queden ocluidas.

▼B

1.4.2. **Líquido receptor**

Se recomienda el uso de un líquido receptor fisiológicamente adecuado, aunque también es posible utilizar otros en casos justificados. Debe indicarse la composición exacta del líquido receptor. Debe demostrarse que la sustancia problema es suficientemente soluble en el líquido receptor, de forma que este no actúe de barrera contra la absorción. Además, el líquido receptor no debe afectar a la integridad del preparado de piel. En un sistema dinámico, el caudal no debe dificultar la difusión de la sustancia problema al líquido receptor. En un sistema estático, hay que agitar continuamente el líquido y tomar muestras de él periódicamente. Si se estudia el metabolismo, el líquido receptor debe permitir que la piel siga estando viva a lo largo de todo el experimento.

1.4.3. **Preparados de piel**

Puede utilizarse piel de origen humano o animal. Se sabe que el uso de piel humana es objeto de condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales. Aunque se prefiere la piel viva, también puede utilizarse piel muerta, siempre que pueda demostrarse su integridad. Son válidas las membranas epidérmicas (separadas enzimática, térmica o químicamente) o la piel con la epidermis y parte de la dermis (normalmente de 200 a 400 μm de espesor), preparadas con un dermatomo. Puede utilizarse piel completa (con la epidermis y toda la dermis), pero ha de evitarse el espesor excesivo (aprox. > 1 mm), salvo que sea necesario específicamente para la determinación de la sustancia problema en las capas de la piel. Deben justificarse la elección de la especie, el lugar anatómico y la técnica de preparación. Es necesario conseguir datos aceptables de un mínimo de cuatro ensayos en paralelo de cada preparado problema.

1.4.4. **Integridad del preparado de piel**

Es fundamental que la piel se prepare adecuadamente. Un tratamiento inapropiado puede provocar lesiones en la capa córnea, por lo que debe comprobarse la integridad de la piel preparada. Si se investiga el metabolismo de la piel, debe utilizarse lo antes posible piel recién extirpada, y en condiciones que permitan la actividad metabólica. Como norma general, la piel recién extirpada debe utilizarse en el plazo de 24 horas, pero el plazo de conservación aceptable puede variar en función del sistema enzimático que intervenga en la metabolización y de la temperatura de conservación (13). En caso de que los preparados de piel no sean recientes cuando se vayan a utilizar, deben presentarse pruebas de que mantienen la función de barrera.

1.4.5. **Sustancia problema**

La sustancia problema es aquella cuyas características de penetración se van a estudiar. Lo mejor es que la sustancia problema esté radiomarcada.

1.4.6. **Preparado problema**

El preparado de la sustancia problema (por ejemplo, material puro, diluido o formulado que contiene la sustancia problema y que se aplica a la piel) debe ser el mismo (o un análogo realista) que aquel al que pueda verse expuesto el hombre u otra posible especie diana. Deben justificarse las eventuales desviaciones respecto al preparado «en uso».

▼B

1.4.7. **Concentraciones y formulaciones de las sustancias problema**

Normalmente se utiliza más de una concentración de la sustancia problema, en la banda superior de la posible exposición humana. Análogamente, debe considerarse someter a ensayo una gama de formulaciones representativas.

1.4.8. **Aplicación a la piel**

En condiciones normales de exposición humana a las sustancias químicas, se suelen encontrar dosis pequeñas. Por tanto, debe aplicarse una cantidad que refleje la exposición humana, normalmente 1-5 $mg/cm^2$ de piel en caso de sólidos y hasta 10 $\mu l/cm^2$ en caso de líquidos. La cantidad debe justificarse en función de las condiciones previstas de uso, de los objetivos del estudio o de las características físicas del preparado problema. Por ejemplo, las aplicaciones a la superficie cutánea pueden ser de grandes dosis cuando se aplican volúmenes importantes por unidad de superficie.

1.4.9. **Temperatura**

La difusión pasiva de sustancias (y, en consecuencia, su absorción por la piel) depende de la temperatura. La cámara de difusión y la piel deben mantenerse a temperatura constante, cerca de la temperatura normal de la piel (32 ± 1 $^oC$). Según el diseño de la célula, será necesario tener temperaturas diferentes en el baño de agua o en el bloque de calentamiento para garantizar que el receptor y la piel están en condiciones fisiológicas. La humedad debe situarse de preferencia entre el 30 y el 70 %.

1.4.10. **Duración de la exposición y toma de muestras**

La exposición de la piel al preparado problema puede mantenerse durante todo el experimento o bien durante plazos más breves (para imitar un tipo específico de exposición humana). El exceso del preparado problema debe lavarse de la piel con un agente de limpieza adecuado y los líquidos de lavado se deben recoger para su análisis. El procedimiento de eliminación del preparado problema dependerá de las condiciones previstas de uso, y debe justificarse. Normalmente hace falta tomar muestras durante un período de 24 horas, para poder caracterizar de forma adecuada la variación de la absorción. Como la integridad de la piel puede empezar a fallar a partir de las 24 horas, el muestreo no debe durar en principio más de ese tiempo. En caso de sustancias problema que penetran rápidamente en la piel, esto puede no ser necesario, pero con sustancias problema que penetran despacio es posible que haga falta un plazo más prolongado. La frecuencia de la toma de muestras de líquido receptor debe permitir la representación gráfica de la variación de la absorción de la sustancia problema.

1.4.11. **Procedimiento final**

Hay que analizar todos los componentes del sistema de ensayo y determinar la recuperación. Se incluyen la cámara donadora, los líquidos de lavado de la superficie de la piel, el preparado de piel y la cámara con el líquido receptor. En ciertos casos, la piel puede fraccionarse en superficie expuesta y en superficie bajo las pestañas de la célula, y en capa córnea, epidermis y dermis, para efectuar análisis aparte.

1.4.12. **Análisis**

En todos los estudios debe conseguirse una recuperación adecuada (el objetivo es conseguir una media del 100 ± 10 % de la radiactividad, y habrá que justificar las eventuales desviaciones). Debe analizarse la cantidad de sustancia problema que se encuentra en el líquido receptor, en el preparado de piel, en los líquidos de lavado de la superficie de la piel y en el líquido de lavado del material, utilizando una técnica adecuada.

▼B

2. **DATOS**

Deben indicarse el análisis del líquido receptor, la distribución de la sustancia problema en el sistema de ensayo y la variación de la absorción a lo largo del tiempo. Cuando se utilizan condiciones de exposición con dosis pequeñas, deben calcularse la cantidad lavada de la piel, la cantidad ligada a la piel (y a las diferentes capas de piel, si se analizan por separado) y la cantidad presente en el líquido receptor (tasa, y cantidad o porcentaje de la dosis aplicada). La absorción de la piel puede expresarse a veces utilizando solo datos del líquido receptor. Sin embargo, si al final del estudio queda sustancia en la piel, puede ser necesario tenerlo en cuenta para calcular la cantidad total absorbida [véase el punto 66 de la referencia (3)]. Cuando se utilizan condiciones de exposición con dosis grandes, los datos pueden permitir el cálculo de una constante de permeabilidad (Kp). En estas últimas condiciones, no es importante el porcentaje absorbido.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir los requisitos establecidos en el protocolo, con una justificación del sistema de ensayo utilizado y con los datos siguientes:

Sustancia problema:

— naturaleza física, propiedades fisicoquímicas (al menos, peso molecular y log $P_{ow}$), pureza (pureza radioquímica),

— información para la identificación (por ejemplo, número de lote),

— solubilidad en el líquido receptor.

Preparado problema:

— formulación y justificación del uso,

— homogeneidad.

Condiciones de ensayo:

— procedencia y lugar de la piel, método de preparación, condiciones de conservación antes del uso, tratamientos previos eventuales (limpieza, tratamiento con antibióticos, etc.), medidas de la integridad de la piel, situación metabólica, justificación del empleo,

— diseño de la célula de difusión, composición del líquido receptor, caudal de líquido receptor o momentos y procedimientos de la toma de muestras,

— datos sobre la aplicación del preparado problema y cuantificación de la dosis aplicada,

— duración de la exposición,

— datos de la eliminación del preparado problema de la piel, como, por ejemplo, lavado de esta,

— datos del análisis de la piel y de las eventuales técnicas de fraccionamiento empleadas para poner de manifiesto la distribución en la piel,

▼B

— método de lavado de la célula de difusión y del material,

— métodos de determinación, técnicas de extracción, límites de detección y validación del método analítico.

Resultados:

— recuperación total del experimento (dosis aplicada ≡ líquidos de lavado de la piel + piel + líquido receptor + líquidos de lavado de la célula),

— cuadros de recuperaciones de las distintas células de difusión en cada compartimento,

— variación de la absorción,

— cuadros de datos de absorción (expresados en tasa, cantidad o porcentaje),

Discusión de los resultados.

Conclusiones.

4. **REFERENCIAS**

1. Método de ensayo B.44. Absorción cutánea: método *in vivo*.

2. OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

3. OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

4. Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

5. Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In Vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237-241.

6. Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* CRC Press, Boca Raton.

7. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

8. Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, FdChem Tox, 37, 191-205.

9. Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

10. Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et* al. (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

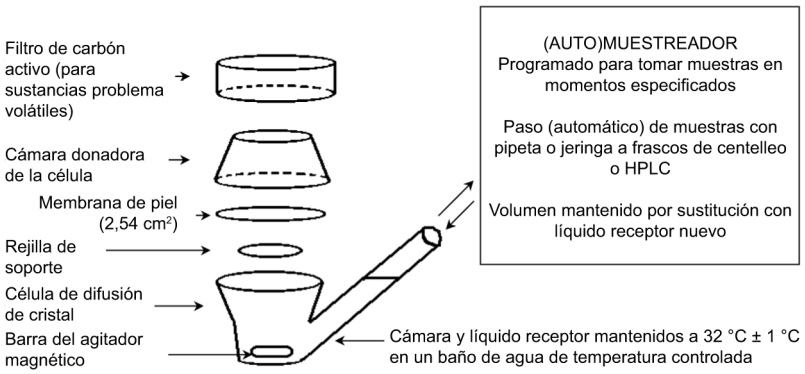
11. Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

12. Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

13. Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356-365.

*Figura 1*

**Ejemplo de diseño clásico de célula de difusión estática para estudios *in vitro* de absorción a través de la piel**



▼M8

## B.46. IRRITACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO CON EPIDERMIS HUMANA RECONSTRUIDA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 439 de la OCDE (2015). La irritación cutánea se refiere a la producción de una lesión reversible de la piel como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema durante un período de hasta 4 horas [según la definición del Sistema Globalmente Armonizado (SGA) de las Naciones Unidas de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos] (1) y del Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea ([1]). El presente método de ensayo proporciona un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse para identificar el peligro que suponen los productos (sustancias y mezclas) irritantes según la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (2). En las regiones que no adoptan la categoría 3 optativa del SGA de las Naciones Unidas (irritantes suaves), este método de ensayo puede utilizarse también para identificar productos no clasificados. Por lo tanto, dependiendo del marco normativo y del sistema de clasificación empleado, este método de ensayo puede utilizarse para determinar la capacidad de irritación cutánea de los productos, ya sea como ensayo de sustitución independiente del ensayo de irritación cutánea *in vivo* o como ensayo de sustitución parcial dentro de una estrategia de ensayo (3).

2. La evaluación de la irritación cutánea suele implicar el uso de animales de laboratorio (método B.4, equivalente a las directrices de ensayo TG 404 de la OCDE, adoptadas originalmente en 1981 y revisadas en 1992, 2002 y 2015) (4). En el caso de la prueba de corrosividad, se han adoptado tres métodos de ensayo *in vitro* validados como método de ensayo B.40 de la UE (equivalente a las directrices de ensayo TG 430 de la OCDE), método de ensayo B.40 *bis* (equivalente a las directrices de ensayo TG 431 de la OCDE) y método de ensayo B.65 (equivalente a las directrices de ensayo TG 435 de la OCDE) (5) (6) (7). Un documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) describe varios módulos que agrupan diversas fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aporta orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) propone un enfoque cuando se precisan más ensayos (3).

3. El presente método de ensayo se refiere al parámetro de salud humana denominado irritación cutánea. Se basa en el sistema de ensayo *in vitro* de epidermis humana reconstruida (EHR), que imita bien las propiedades bioquímicas y fisiológicas de las partes superiores de la piel humana, es decir, la epidermis. El sistema de ensayo de EHR utiliza queratinocitos no transformados, obtenidos de seres humanos, como fuente de células para reconstruir un modelo de epidermis con histología y citoarquitectura representativas. Se dispone de normas de comportamiento para facilitar la validación y evaluación de métodos de ensayo basados en el RHE similares y modificados, de conformidad con los principios del documento de orientación n.º 34 de la OCDE (8) (9). Las directrices de ensayo correspondientes se adoptaron originalmente en 2010, se actualizaron en 2013 para incluir modelos adicionales de EHR, y se actualizaron de nuevo en 2015 para hacer referencia al documento de orientación sobre los IATA e introducir el uso de un procedimiento alternativo de medición de la viabilidad.

4. Se han completado estudios de prevalidación, optimización y validación de cuatro modelos de ensayo *in vitro* disponibles en el mercado (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) sobre la base del sistema de ensayo de EHR (sensibilidad del 80 %, especificidad del 70 %, y exactitud del 75 %). Estos cuatro modelos de ensayo

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M8

están incluidos en el presente método de ensayo y se enumeran en el apéndice 2, que también proporciona información sobre el tipo de estudio de validación utilizado para validar los respectivos métodos de ensayo. Como se indica en el apéndice 2, el método de referencia validado (MRV) se ha utilizado para desarrollar el presente método de ensayo y las normas de comportamiento (8).

5. Solo se garantizará la aceptación mutua de datos de la OCDE en relación con los modelos de ensayo validados con arreglo a las normas de comportamiento (8) si estos modelos de ensayo han sido revisados y adoptados por la OCDE. Los modelos de ensayo incluidos en el presente método de ensayo y las correspondientes directrices de ensayo de la OCDE pueden utilizarse indistintamente para cumplir los requisitos de los países en cuanto a los resultados de los ensayos obtenidos con los métodos de ensayo *in vitro* para detectar la irritación cutánea, al tiempo que disfrutan de la aceptación mutua de datos.

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones de los términos utilizados en el presente documento.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

7. Una limitación del método de ensayo, demostrada por el estudio prospectivo completo de validación para la evaluación y caracterización de los métodos de ensayo con EHR (16), es que no permite la clasificación de productos en la categoría optativa 3 del SGA de las Naciones Unidas (irritantes suaves) (1). Por tanto, el marco normativo aplicable en los Estados miembros determinará la forma de utilizar el presente método de ensayo. En el caso de la UE, la categoría 3 no se ha incluido en el Reglamento CLP. Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una exposición cutánea única, debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (3). Se reconoce que el uso de piel humana está sujeto a condiciones y consideraciones éticas tanto nacionales como internacionales.

8. El presente método de ensayo se refiere al parámetro de salud humana denominado irritación cutánea. Aunque el presente método de ensayo no aporta información adecuada sobre la corrosión cutánea, ha de observarse que el método B.40 *bis* (equivalente a las directrices de ensayoTG 431 de la OCDE) sobre corrosión cutánea se basa en el mismo sistema de ensayo con EHR, si bien utilizando un protocolo distinto (6). El presente método se basa en modelos de EHR que utilizan queratinocitos humanos, los cuales, por lo tanto, representan *in vitro* el órgano diana de la especie de interés. Además, cubre directamente la fase inicial de la cascada inflamatoria o mecanismo de acción (el daño celular y tisular que acaba en un traumatismo localizado) que sucede durante la irritación *in vivo*. Durante la validación del presente método se ha sometido a ensayo una amplia variedad de productos químicos, y la base de datos del estudio de validación contaba con 58 productos en total (16) (18) (23). El método de ensayo es aplicable a sólidos, líquidos, semisólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Siempre que sea posible, los sólidos deben molerse hasta convertirse en polvo fino antes de su aplicación; no se requiere ningún otro tratamiento previo de la muestra. Aún no se ha efectuado ningún estudio de validación con gases y aerosoles (29). Aunque no hay que descartar que los gases y aerosoles puedan estudiarse utilizando la tecnología de EHR, el actual método de ensayo no permite hacerlo.

9. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo. Sin embargo, debido al hecho de que las mezclas abarcan un amplio espectro de categorías y composiciones, y que actualmente se dispone de información solo limitada sobre los ensayos de mezclas, en los casos en los que pueda demostrarse la inaplicabilidad del método de ensayo a una determinada categoría de mezclas (por ejemplo, a

▼M8

raíz de una estrategia como la propuesta en Eskes *et al*., 2012) (30), el método no deberá utilizarse con tal categoría específica de mezclas. Debe prestarse una atención similar en el caso de que se encuentren clases químicas o propiedades fisicoquímicas específicas que no sean aplicables al método de ensayo actual.

10. Los productos problema que absorben la luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT y los productos problema capaces de reducir directamente el colorante vital MTT (a formazano de MTT) pueden interferir con las mediciones de la viabilidad celular y hacen necesario el uso de testigos adaptados para efectuar las correcciones oportunas (véanse los puntos 28-34).

11. Una sola tanda de ensayos, formada por tres réplicas del tejido, debería ser suficiente para una sustancia problema, si la clasificación es clara. Sin embargo, en casos de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas o el de un porcentaje de viabilidad media igual al 50 ± 5 %, debería plantearse la conveniencia de efectuar una segunda tanda, así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

12. El producto problema se aplica tópicamente a un modelo de EHR tridimensional, formado por queratinocitos epidérmicos no transformados, obtenidos de seres humanos, que se han cultivado para formar un modelo de la epidermis humana bien diferenciado en varias capas. Consiste en los estratos basal, espinoso y granuloso organizados, y en un estrato córneo con varias capas intercelulares laminares de lípidos, que representan las principales clases de lípidos análogas a las que se encuentran *in vivo*.

13. La irritación cutánea inducida por un producto, que se manifiesta fundamentalmente con eritema y edema, es el resultado de una cascada de acontecimientos que comienzan con la penetración del producto a través del estrato córneo, donde pueden dañar las capas subyacentes de queratinocitos y otras células de la piel. Las células dañadas pueden liberar mediadores de la inflamación o inducir una cascada inflamatoria, que también actúa sobre las células de la dermis, en particular las células del estroma o del endotelio de los vasos sanguíneos. La dilatación y el aumento de la permeabilidad de las células endoteliales son los factores que producen el eritema y el edema observados (29). En particular, los métodos de ensayo basados en la EHR, dada la falta de vascularización en el sistema de ensayo *in vitro*, miden los sucesos que inician la cascada, por ejemplo el daño de células y tejidos (16) (17), utilizando la viabilidad celular como indicador.

14. La viabilidad celular se mide en los modelos de EHR mediante la conversión enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo; número CAS 298-93-1] en una sal de formazano azul que se mide cuantitativamente tras su extracción de los tejidos (31). Los productos irritantes se identifican por su capacidad de reducir la viabilidad celular por debajo de unos umbrales definidos (es decir, ≤ 50 %, en el caso los de irritantes de la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP). En función del marco normativo y de la aplicabilidad del método de ensayo, los productos problema que producen viabilidades celulares por encima del nivel umbral definido pueden considerarse no irritantes (es decir, > 50 %, sin categoría).

▼M8

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

15. Antes de proceder al uso sistemático de cualquiera de los cuatro modelos de ensayo validados que se ajustan al presente método de ensayo (apéndice 2), los laboratorios deben demostrar su competencia técnica utilizando las diez sustancias para la prueba de la competencia recogidas en el cuadro 1. En situaciones en que, por ejemplo, no esté disponible una sustancia de la lista, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* [por ejemplo, de la lista de productos de referencia (8)] siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los descritos en el cuadro 1. Debe justificarse el uso de una sustancia alternativa para la prueba de la competencia.

16. Como parte del ejercicio de demostración de la competencia, se recomienda que el usuario verifique las propiedades de barrera de los tejidos tras su recepción, siguiendo las especificaciones del fabricante del modelo de EHR. Este aspecto es particularmente importante si el envío de los tejidos implica grandes distancias o largos plazos. Una vez se haya establecido con éxito un método de ensayo y se haya adquirido y demostrado la competencia para su uso, no será necesario efectuar esta verificación de forma sistemática. Sin embargo, cuando se utilice regularmente un método de ensayo, se recomienda seguir evaluando las propiedades de barrera a intervalos periódicos.

*Cuadro 1*

**Sustancias para la prueba de la competencia** [1]

| Sustancia | N.º CAS | Puntuación *in vivo* [2] | Estado físico | Categoría del SGA de las Naciones Unidas |
|---|---|---|---|---|
| **SUSTANCIAS NO CLASIFICADAS (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas)** | | | | |
| Ácido naftaleno-acético | 86-87-3 | 0 | Sólido | Sin categoría |
| Isopropanol | 67-63-0 | 0,3 | Líquido | Sin categoría |
| Estearato de metilo | 112-61-8 | 1 | Sólido | Sin categoría |
| Butirato de heptilo | 5870-93-9 | 1,7 | Líquido | Sin categoría *(Categoría optativa 3)* [3] |
| Salicilato de hexilo | 6259-76-3 | 2 | Líquido | Sin categoría *(Categoría optativa 3)* [3] |
| **SUSTANCIAS CLASIFICADAS (Categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas)** | | | | |
| Aldehído ciclámico | 103-95-7 | 2,3 | Líquido | Cat. 2 |
| 1-Bromohexano | 111-25-1 | 2,7 | Líquido | Cat. 2 |
| Hidróxido de potasio (solución acuosa al 5 %) | 1310-58-3 | 3 | Líquido | Cat. 2 |
| 1-Metil-3-fenil-1-piperazina | 5271-27-2 | 3,3 | Sólido | Cat. 2 |
| Heptanal | 111-71-7 | 3,4 | Líquido | Cat. 2 |

(1) Las sustancias para la prueba de la competencia son un subconjunto de las sustancias utilizadas en el estudio de validación y la selección se basa en los siguientes criterios: i) las sustancias están disponibles en el comercio; ii) son representativas de toda la gama de resultados de la prueba de irritación de Draize (desde no irritantes hasta muy irritantes); iii) tienen una estructura química bien definida; iv) son representativas de la funcionalidad química utilizada en el proceso de validación; v) han facilitado resultados *in vitro* reproducibles en varios ensayos y en varios laboratorios; vi) se han predecido *in vitro* correctamente, y vii) no están asociadas con un perfil extremadamente tóxico (por ejemplo, carcinogénesis o toxicidad para el sistema reproductor) y no están asociados con unos costes de eliminación prohibitivos.

(2) Puntuación *in vivo* de acuerdo con el método de ensayo B.4 (4).

(3) Según el presente método de ensayo, la categoría optativa 3 del SGA de las Naciones Unidas (irritantes suaves) (1) se considera como sin categoría.

▼M8

PROCEDIMIENTO

17. A continuación se describen los componentes y procedimientos de un método de ensayo con EHR para la evaluación de la irritación cutánea (véanse también en el apéndice 3 los parámetros relacionados con cada modelo de ensayo). Se dispone de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para los cuatro modelos que se ajustan al presente método de ensayo (32) (33) (34) (35).

COMPONENTES DEL MÉTODO DE ENSAYO EHR

**Condiciones generales**

18. Para reconstruir el epitelio deben utilizarse queratinocitos humanos no transformados. Bajo un estrato córneo funcional, deben encontrarse varias capas de células epiteliales viables (estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso). El estrato córneo debe constar de varias capas con el perfil lipídico necesario para constituir una barrera funcional con la suficiente resistencia contra la penetración rápida de productos citotóxicos de referencia como, por ejemplo, dodecilsulfato de sodio (DSS) o tritón X-100. La existencia de la función de barrera debe demostrarse, y puede evaluarse determinando la concentración a la que el producto de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % ($CI_{50}$) tras un tiempo fijo de exposición, o bien determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % ($TE_{50}$) tras la aplicación del producto de referencia a una concentración fija especificada. Las propiedades de aislamiento del modelo de EHR deben evitar que pase material del estrato córneo al tejido viable, lo que reduciría la calidad del modelo en cuanto a la exposición de la piel. El modelo de EHR debe estar exento de contaminación por bacterias, virus, micoplasmas u hongos.

**Condiciones funcionales**

*Viabilidad*

19. El ensayo utilizado para cuantificar la viabilidad es el ensayo de MTT (31). Las células viables de la construcción tisular de EHR pueden reducir el colorante vital MTT a un precipitado azul de formazano de MTT, que se extrae del tejido utilizando isopropanol (o un disolvente similar). La densidad óptica (DO) del disolvente de extracción solo debe ser suficientemente baja, es decir, DO < 0,1. El formazano de MTT extraído puede cuantificarse utilizando una medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (36). Los usuarios del modelo de EHR deben asegurarse de que cada lote utilizado de este modelo cumple los criterios definidos en relación con el testigo negativo. El diseñador o proveedor del modelo de EHR debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límite superior e inferior) de los valores de DO de los testigos negativos (en las condiciones del método de ensayo de irritación cutánea). En el cuadro 2 figuran los intervalos de aceptabilidad correspondientes a los cuatro modelos de ensayo de EHR validados que se incluyen en el presente método de ensayo. Como criterio de aceptación del testigo negativo, los usuarios de la espectrofotometría con HPLC/UPLC deben utilizar los intervalos de DO del testigo negativo que figuran en el cuadro 2. Hay que demostrar documentalmente que los tejidos tratados con el testigo negativo son estables en cultivo (proporcionan unas mediciones similares de la viabilidad) durante todo el tiempo de exposición del ensayo.

*Cuadro 2*

**Intervalos de aceptabilidad de los valores de DO del testigo negativo de los modelos de ensayo incluidos en el presente método de ensayo**

| | Límite inferior de aceptación | Límite superior de aceptación |
|---|---|---|
| EpiSkin™ (SM) | ≥ 0,6 | ≤ 1,5 |
| EpiDerm™ SIT (EPI-200) | ≥ 0,8 | ≤ 2,8 |

▼M8

| | Límite inferior de aceptación | Límite superior de aceptación |
|---|---|---|
| SkinEthic™ RHE | ≥ 0,8 | ≤ 3,0 |
| LabCyte EPI-MODEL24 SIT | ≥ 0,7 | ≤ 2,5 |

*Función de barrera*

20. El estrato córneo y su composición lipídica deben ser suficientes para impedir la penetración rápida de los productos citotóxicos de referencia (por ejemplo, DSS o tritón X-100), evaluada mediante la $CI_{50}$ o el $TE_{50}$ (véase el cuadro 3).

*Morfología*

21. Debe aportarse un examen histológico del modelo de EHR que demuestre una estructura similar a la de la epidermis humana (incluido un estrato córneo de varias capas).

*Reproducibilidad*

22. Los resultados de los testigos positivos y negativos del método de ensayo deben demostrar su reproducibilidad a lo largo del tiempo.

*Control de calidad (CC)*

23. El modelo de EHR solo debe utilizarse si el diseñador o proveedor demuestra que cada lote del modelo utilizado cumple los criterios definidos de aprobación de la producción, los más importantes de los cuales son los relativos a la viabilidad (punto 19), a la función de barrera (punto 20) y a la morfología (punto 21). Estos datos deben proporcionarse a los usuarios del método de ensayo, de manera que puedan incluirlos en el informe del ensayo. El diseñador o proveedor del modelo de EHR debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límite superior e inferior) de los valores de $CI_{50}$ o $TE_{50}$. Para conseguir una asignación fiable de la clasificación en cuanto al efecto irritante, solo pueden aceptarse los resultados obtenidos con tejidos adecuados. En el cuadro 3 figuran los intervalos de aceptabilidad correspondientes a los cuatro modelos de ensayo que se incluyen en el presente método de ensayo.

*Cuadro 3*

**Criterios de control de calidad para la aprobación de los lotes de los modelos de ensayo incluidos en el presente método de ensayo**

| | Límite inferior de aceptación | Límite superior de aceptación |
|---|---|---|
| EpiSkin™ (SM) (18 horas de tratamiento con DSS) (32) | $CI_{50}$ = 1,0 mg/ml | $CI_{50}$ = 3,0 mg/ml |
| EpiDerm™ SIT (EPI-200) (Tritón X-100 al 1 %) (33) | $TE_{50}$ = 4,0 horas | $TE_{50}$ = 8,7 horas |
| SkinEthic™ RHE (Tritón X-100 al 1 %) (34) | $TE_{50}$ = 4,0 horas | $TE_{50}$ = 10,0 horas |
| LabCyte EPI-MODEL24 SIT (18 horas de tratamiento con DSS) (35) | $CI_{50}$ = 1,4 mg/ml | $CI_{50}$ = 4,0 mg/ml |

▼M8

**Aplicación de los productos problema y testigo**

24. En cada tanda deben utilizarse al menos tres réplicas con cada producto problema y cada testigo. En caso de productos líquidos, así como sólidos, debe aplicarse una cantidad de producto problema suficiente para cubrir uniformemente la superficie de la epidermis pero evitando una dosis excesiva, es decir, en un intervalo de 26 a 83 µl/$cm^2$ o mg/$cm^2$ (véase el apéndice 3). En caso de productos sólidos, antes de aplicarlos debe humedecerse la superficie de la epidermis con agua desionizada o destilada, para mejorar el contacto de dicha superficie con el producto problema. Siempre que sea posible, los sólidos deben someterse a ensayo en forma de polvo fino. En algunos casos puede utilizarse una malla de nailon como ayuda para extender el producto (véase el apéndice 3). Al final del período de exposición, el producto problema debe retirarse cuidadosamente de la superficie de la epidermis lavando con una solución amortiguadora acuosa o una solución de NaCl al 0,9 %. En función de los modelos de ensayo de EHR utilizados, el período de exposición oscila entre los 15 y los 60 minutos, y la temperatura de incubación entre los 20 y 37 °C. Estos períodos de exposición y temperaturas se optimizan para cada método de ensayo con EHR y representan las distintas propiedades intrínsecas de los modelos de ensayo (por ejemplo, función de barrera) (véase el apéndice 3).

25. Deben utilizarse en cada tanda un testigo negativo (TN) y un testigo positivo (TP) en paralelo para demostrar que la viabilidad (con el testigo negativo), la función de barrera y la sensibilidad tisular resultante (con el TP) de los tejidos se encuentran dentro de un intervalo de aceptación histórico definido. Como TP se sugiere una solución acuosa de DSS al 5 %. Como TN se sugiere agua o una solución salina amortiguadora de fosfato (PBS).

**Medición de la viabilidad celular**

26. Según el procedimiento de ensayo, es fundamental que la medición de la viabilidad no se realice inmediatamente después de la exposición al producto problema, sino después de un período de incubación del tejido lavado, en medio fresco, durante un tiempo suficiente tras el tratamiento. Este período permite tanto la recuperación de los eventuales efectos citotóxicos débiles como la aparición de efectos citotóxicos claros. Durante la optimización del ensayo de dos de los modelos de ensayo basados en la EHR subyacentes a este método de ensayo, se observó que es óptimo el período de incubación de 42 horas tras el tratamiento (11) (12) (13) (14) (15).

27. El ensayo del MTT es un método cuantitativo normalizado que debe utilizarse para medir la viabilidad celular según el presente método de ensayo. Es compatible con el uso de una construcción tisular tridimensional. La muestra de tejido se coloca en una solución de MTT de la concentración adecuada (p. ej., 0,3-1 mg/ml) durante 3 horas. Las células viables transforman el MTT en formazano azul. A continuación, el producto de formazano azul precipitado se extrae del tejido utilizando un disolvente (p. ej., isopropanol, isopropanol ácido), y la concentración de formazano se mide determinando la DO a 570 nm con un paso de banda máximo de ± 30 nm, o mediante un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (véase el punto 34) (36).

28. Pueden interferir con el ensayo las propiedades ópticas del producto problema o su acción química sobre el MTT (por ejemplo, ciertos productos pueden impedir o invertir la formación de color, así como causarla), lo que dará lugar a una estimación errónea de la viabilidad. Puede ocurrir así cuando un producto problema determinado no se elimina completamente del tejido por el lavado o cuando penetra en la epidermis. Si el producto problema actúa directamente sobre el MTT (p. ej., un reductor de este), tiene color natural o se colorea durante el tratamiento del tejido, deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir la posible interferencia del

▼M8

producto problema con la técnica de medición de la viabilidad (véanse los puntos 29 y 33). En los procedimientos normalizados de trabajo correspondientes a los cuatro modelos validados incluidos en el presente método de ensayo puede encontrarse una descripción pormenorizada de la forma de corregir la reducción directa del MTT y las interferencias debidas a agentes colorantes (32) (33) (34) (35).

29. Para identificar los reductores directos del MTT, cada producto problema debe añadirse a una solución de MTT recién preparada. Si la mezcla de MTT que contiene el producto problema se pone azul/violeta, se supone que el producto problema reduce directamente el MTT y debe efectuarse otro control funcional con tejidos de EHR inviables, con independencia de que se utilice la medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC. Este control funcional adicional emplea tejidos muertos que solo poseen actividad metabólica residual, pero que absorben el producto problema de forma similar a los tejidos viables. Cada producto problema reductor del MTT se aplica al menos a dos réplicas de tejido muerto que se someten a todo el procedimiento de ensayo para generar una reducción inespecífica del MTT (NSMTT) (32) (33) (34) (35). Un solo control NSMTT es suficiente por producto problema, independientemente del número realizado de ensayos o tandas independientes. La viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos sometidos al reductor del MTT menos el porcentaje de reducción inespecífica del MTT obtenido con los tejidos muertos expuestos al mismo reductor del MTT, calculados en relación con el testigo negativo aplicado en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSMTT).

30. Para detectar la posible interferencia debida a productos problema coloreados o que se colorean cuando se ponen en contacto con el agua o el isopropanol y decidir sobre si es necesario efectuar más controles, debe llevarse a cabo un análisis espectral del producto problema en agua (entorno durante la exposición) y/o en isopropanol (solución de extracción). Si el producto problema en agua o isopropanol absorbe luz en el intervalo de 570 ± 30 nm, deben llevarse a cabo otros controles del colorante o, como alternativa, debe utilizarse un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC, en cuyo caso estos controles no son necesarios (véanse los puntos 33 y 34). Cuando se realiza la medición normal de la absorbancia (DO), cada producto problema coloreado que interfiere se aplica en al menos dos réplicas de tejido viable, que se someten al procedimiento de ensayo completo, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT para generar un control de color inespecífico ($NSC_{vivo}$). El control $NSC_{vivo}$ debe realizarse al mismo tiempo que los ensayos del producto problema coloreado y, en caso de ensayos múltiples, debe llevarse a cabo un control $NSC_{vivo}$ independiente con cada ensayo realizado (en cada tanda) debido a la variabilidad biológica inherente de los tejidos vivos. A continuación, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con una solución de MTT menos el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, efectuado todo al mismo tiempo que el ensayo que se está corrigiendo (% $NSC_{vivo}$).

31. Los productos problema que se identifican como causantes tanto de reducción directa del MTT (véase el punto 29) como de interferencia de color (véase el punto 30) también requerirán un tercer conjunto de controles, aparte de los controles NSMTT y $NSC_{vivo}$ que se describen en los puntos anteriores, cuando se lleva a cabo la medición normal de la absorbancia (DO). Este es generalmente así en el caso de los productos problema de

▼M8

color oscuro que interfieren con el ensayo del MTT (p. ej., azul, violeta, negro) porque su color intrínseco impide la evaluación de su capacidad para reducir directamente el MTT, tal como se describe en el punto 29. Estos productos problema pueden unirse tanto a los tejidos vivos como a los muertos y, por tanto, el controlNSMTT puede facilitar la corrección no solo de la posible reducción directa del MTT por el producto problema, sino también de la interferencia de color derivada de la unión del producto problema a los tejidos muertos. Esto podría dar lugar a una doble corrección por la interferencia de color, puesto que el $NSC_{vivo}$ ya corrige la interferencia de color derivada de la unión del producto problema a los tejidos vivos. Para evitar una posible doble corrección por la interferencia de color, es necesario realizar un tercer control de color inespecífico con tejidos muertos ($NSC_{muerto}$). En este testigo adicional, el producto problema se aplica en al menos dos réplicas de tejido muerto, que se someten a todo el procedimiento de ensayo, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT. Un solo testigo de $NSC_{muerto}$ es suficiente por producto problema cualquiera que sea el número de ensayos o tandas independientes realizados, pero debe aplicarse al mismo tiempo que el control NSMTT y, en la medida de lo posible, con el mismo lote de tejidos. A continuación, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema menos el % NSMTT menos el % $NSC_{vivo}$ más el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos muertos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, calculado en relación con el testigo negativo que se lleva a cabo en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% $NSC_{muerto}$).

32. Es importante señalar que las interferencias de reducción inespecífica del MTT y de color inespecífico pueden aumentar las lecturas del extracto tisular por encima del intervalo de linealidad del espectrofotómetro. Sobre esta base, cada laboratorio debe determinar el intervalo de linealidad de su espectrofotómetro con formazano de MTT (n.º CAS 57360-69-7) procedente de una fuente comercial antes de iniciar el ensayo de los productos problema con fines normativos. La medición normal de la absorbancia (DO) mediante el uso de un espectrofotómetro es adecuada para evaluar los productos problema que son reductores directos del MTT y los que interfieren con el color, cuando las DO de los extractos tisulares obtenidas con el producto problema sin ninguna corrección por la reducción directa del MTT o la interferencia de color se encuentran dentro del intervalo lineal del espectrofotómetro o cuando la viabilidad porcentual sin corregir obtenida con el producto problema ya es $\leq$ 50 %. No obstante, los resultados correspondientes a productos problema que muestran un % NSMTT o un % $NSC_{vivo}$ $\geq$ 50 % del testigo negativo deben tomarse con precaución, ya que este es el umbral utilizado para distinguir los productos clasificados de los no clasificados (véase el punto 36).

33. En el caso de los productos problema coloreados que no son compatibles con la medición normal de la absorbancia (DO) debido a una interferencia demasiado fuerte con el ensayo del MTT, puede emplearse el procedimiento alternativo de espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT (véase el punto 34) (36). El sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC permite separar el formazano de MTT del producto problema antes de su cuantificación (36). Por esta razón, los controles $NSC_{vivo}$ o $NSC_{muerto}$ no son necesarios nunca si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, independientemente del producto sometido a ensayo. No obstante, deben utilizarse los controles NSMTT si se sospecha que el producto problema reduce directamente el MTT o tiene un color que obstaculiza la evaluación de la capacidad de reducir directamente MTT (tal como se describe en el punto 29). Cuando se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. En el caso de los productos problema capaces de reducir directamente el MTT, la viabilidad tisular real se calcula como el porcentaje

▼M8

de la viabilidad tisular obtenida con los tejidos vivos expuestos al producto problema menos el porcentaje de NSMTT. Por último, hay que señalar que no pueden evaluarse los reductores directos de MTT que también pueden interferir con el color, que se mantienen en los tejidos después del tratamiento y reducen el MTT de manera tan intensa que llevan a unas DO (con medición normal de la DO) o a unas áreas bajo el pico (con espectrofotometría UPLC/HPLC) de los extractos tisulares analizados que quedan fuera del intervalo de linealidad del espectrofotómetro, aunque se espera que estos casos se produzcan solo en muy raras situaciones.

34. La espectrofotometría con HPLC/UPLC puede utilizarse también para medir el formazano de MTT con todos los tipos de productos problema (con color, sin color, reductores del MTT, no reductores del MTT) (36). Debido a la diversidad de sistemas de espectrofotometría con HPLC/UPLC, antes de utilizar un sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC para cuantificar el formazano de MTT en extractos tisulares, ha de demostrarse que es apto a tal fin mediante el cumplimiento de los criterios de aceptación respecto a un conjunto de parámetros normales de aptitud sobre la base de los descritos en el documento de orientación de la Food and Drug Administration de EE. UU. para la industria sobre la validación de métodos bioanalíticos (36) (37). Estos parámetros clave y sus criterios de aceptación figuran en el apéndice 4. Una vez se hayan cumplido los criterios de aceptación definidos en el apéndice 4, se considera que el sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC es apto y está listo para medir el formazano de MTT en las condiciones experimentales descritas en el presente método de ensayo.

**Criterios de aceptabilidad**

35. En cada método de ensayo en que se utilicen lotes válidos de modelos de EHR (véase el punto 23), los tejidos tratados con el TN deben presentar una DO que refleje la calidad de los tejidos que hayan pasado por las fases de transporte y recepción y por todos los procesos del protocolo. Los valores de DO del testigo no deben ser inferiores a los límites históricamente establecidos. Análogamente, los tejidos tratados con el TP, es decir solución acuosa de DSS al 5 %, deben reflejar su capacidad de responder a un producto irritante en las condiciones del método de ensayo [véase el apéndice 3 y, para más información, los procedimientos normalizados de trabajo de los cuatro modelos de ensayo incluidos en las presentes directrices de ensayo (32) (33) (34) (35)]. Las mediciones asociadas y adecuadas de la variabilidad entre las réplicas tisulares, es decir las desviaciones típicas (DT), deben estar dentro de los límites de aceptación establecidos para el modelo de ensayo utilizado (véase el apéndice 3).

**Interpretación de los resultados y modelo de asignación**

36. Los valores de DO obtenidos con cada producto problema pueden utilizarse para calcular el porcentaje de viabilidad normalizada respecto al TN, que se fija en el 100 %. Si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. Es necesario definir claramente y documentar, así como demostrar que son adecuados, el valor umbral del porcentaje de viabilidad celular que permite distinguir los productos problema irritantes de los no clasificados, y el procedimiento o procedimientos estadísticos utilizados para evaluar los resultados e identificar los productos irritantes (véase más información en los procedimientos normalizados de trabajo). A continuación se indican los valores umbral para la asignación del efecto irritante:

▼M8

— Se considera que el producto problema requiere clasificación y etiquetado con arreglo al SGA de las Naciones Unidas y al CLP (categoría 2 o categoría 1) si el porcentaje medio de viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras el tratamiento es inferior o igual (≤) al 50 %. Dado que los modelos de ensayo con EHR incluidos en este método de ensayo no pueden distinguir entre las categorías 1 y 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, se exigirá más información sobre la corrosión cutánea para decidir sobre su clasificación final [véase también el documento de orientación de la OCDE sobre los IATA (3)]. Si se considera que el producto problema no es corrosivo (por ejemplo, sobre la base de los métodos de ensayo B.40, B.40 *bis* o B.65), y muestra una viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras el tratamiento inferior o igual (≤) al 50 %, se considera que el producto problema es irritante para la piel de acuerdo con la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

— En función del marco normativo de los países miembros, el producto problema puede considerarse no irritante para la piel sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP si la viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras el tratamiento es superior (>) al 50 %.

DATOS E INFORME

**Datos**

37. Respecto a cada tanda, deben recogerse en un cuadro los datos obtenidos con las distintas réplicas de tejido (p. ej., los valores de DO y los porcentajes de viabilidad celular calculados para cada producto problema, con la clasificación), incluidos los datos de los experimentos repetidos, en su caso. Además, deben indicarse las medias ± desviación típica de cada tanda. Con respecto a cada producto estudiado, deben indicarse las interacciones observadas con el reactivo MTT y los productos problema coloreados.

**Informe del ensayo**

38. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Productos problema y testigo:*

— Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;

— Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— Origen; número de lote, si está disponible;

— Tratamiento del producto problema / productos testigo antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha para nuevo análisis, si se conoce;

— Condiciones de conservación.

Modelo de EHR y protocolo utilizados (y justificación de la elección, si procede).

▼**M8**

*Condiciones de ensayo:*

— Modelo de EHR utilizado (incluido el número de lote);

— Información sobre la calibración del dispositivo de medición (p. ej., espectrofotómetro), la longitud de onda y el paso de banda (si procede) utilizados para cuantificar el formazano de MTT y el intervalo de linealidad del dispositivo de medición;

— Descripción del método utilizado para cuantificar el MTT de formazano; Descripción de la aptitud del sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC, si procede; Información justificativa completa sobre el modelo de EHR concreto utilizado, incluido su comportamiento. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:

i) la viabilidad;

ii) la función de barrera;

iii) la morfología;

iv) la reproducibilidad y la capacidad de asignación;

v) los controles de calidad (CC) del modelo;

— Referencia a datos históricos del modelo. Esto debe incluir, entre otras cosas, la aceptabilidad de los datos de control de calidad con referencia a los datos históricos del lote.

— Demostración de la competencia para la realización del método de ensayo antes de su uso sistemático mediante ensayo de las sustancias para la prueba de la competencia.

*Procedimiento de ensayo:*

— Detalles del procedimiento de ensayo utilizado (incluidos los procedimientos de lavado utilizados tras el período de exposición); Dosis del producto problema y de los productos testigo utilizados;

— Duración y temperatura de la exposición y período de incubación tras la exposición;

— Indicación de los controles utilizados con productos problema que son reductores directos del MTT y/o colorantes, en su caso;

— Número de réplicas tisulares utilizadas con cada producto problema y testigo (TP, testigo negativo, y NSMTT, $NSC_{vivo}$ y $NSC_{muerto}$, en su caso);

— Descripción de los criterios de decisión / modelo de asignación aplicados sobre la base del modelo de EHR utilizado;

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo (incluidos los procedimientos de lavado).

*Criterios de aceptación de las tandas y del ensayo:*

— Valores medios e intervalos de aceptación de los testigos positivos y negativos a partir de datos históricos;

▼**M8**

— Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares con respecto a los testigos positivos y negativos; Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares correspondientes a cada producto problema.

*Resultados:*

— Cuadros de datos de las mediciones con cada producto problema, cada tanda y cada réplica, incluidas la DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular, el porcentaje medio de viabilidad tisular y la desviación típica;

— En su caso, los resultados de los controles utilizados en relación con los productos problema que son reductores directos del MTT o colorantes, incluida la DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el % NSMTT, el % $NSC_{vivo}$, el % $NSC_{muerto}$, las desviaciones típicas y el porcentaje final correcto de viabilidad tisular;

— Resultados obtenidos con el producto o productos problema y testigos en relación con los criterios definidos de aceptación de las tandas y del ensayo;

— Descripción de otros efectos observados;

— Clasificación derivada con referencia al modelo de asignación o a los criterios de decisión utilizados.

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2013. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html.

(2) EURL-ECVAM (2009). Statement on the «Performance Under UN GHS of Three *In Vitro* Assays for Skin Irritation Testing and the Adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM Skin Irritation Performance Standards», Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 9 April 2009. Disponible en: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC31_skin-irritation-statement_20090922.pdf

(3) OCDE (2014). Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment for Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 203), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(4) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.

(5) Capítulo B.40 del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: Resistencia eléctrica transcutánea (RET):

(6) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: Método de ensayo con epidermis humana reconstruida (EHR).

(7) Capítulo B.65 del presente anexo, Método de ensayo con barrera de membrana *in vitro*.

▼**M8**

(8) OCDE (2015). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human *Epidermis* (RhE) Test Methods for Skin Irritation in Relation to TG 439. Environment, health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 220). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(9) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(10) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J.J. M. and Botham, P. (2001). A Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, Results and Evaluation by the Management Team, *Toxicol. in Vitro* 15, 57-93.

(11) Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002). Refinement of the EPISKIN Protocol for the Assessment of Acute Skin Irritation of Chemicals: Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study, *Toxicol. in Vitro* 16, 765–770.

(12) Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004). Optimisation of the EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests, *ALTEX* 21, 107–114.

(13) Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm Test Protocol for the Upcoming ECVAM Validation Study on *In Vitro* Skin Irritation Tests – An Assessment of the Performance of the Optimised Test, *ATLA* 33, 351-367.

(14) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005). The *In Vitro* Acute Skin Irritation of Chemicals: Optimisation of the EPISKIN Prediction Model Within the Framework of the ECVAM Validation Process, *ATLA* 33, 329-349.

(15) Zuang, V., Balls, M., Botham, P.A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R.D., Elliot, G.R., Fentem, J.H., Heylings, J.R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J.J.M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002). Follow-Up to the ECVAM Prevalidation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, *ATLA* 30, 109-129.

(16) Spielmann, H., Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Report on the Validity of the EPISKIN and EpiDerm Assays and on the Skin Integrity Function Test, *ATLA* 35, 559-601.

(17) Hoffmann S. (2006). ECVAM Skin Irritation Validation Study Phase II: Analysis of the Primary Endpoint MTT and the Secondary Endpoint IL1-α.

(18) Eskes C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Acute Skin Irritation: Selection of Test Chemicals, *ATLA* 35, 603-619.

(19) Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007). *In Vitro* Acute Skin Irritancy of Chemicals Using the Validated EPISKIN Model in a Tiered Strategy - Results and Performances with 184 Cosmetic Ingredients, *ALTEX*, 14, 351-358.

▼**M8**

(20) EURL-ECVAM (2007). Statement on the validity of in vitro tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. Available at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication//ESAC26_statement_SkinIrritation_20070525_C.pdf

(21) EURL ECVAM. (2007). Performance Standards for Applying Human Skin Models to *In Vitro* Skin Irritation Testing. *Nota: Se trata de las normas de comportamiento originales utilizadas para la validación de dos métodos de ensayo. Estas normas de comportamiento no deben seguir utilizándose, dado que ahora se dispone de una versión actualizada (8).*

(22) EURL ECVAM. (2008). Statement on the Scientific Validity of *In Vitro* Tests for Skin Irritation Testing, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/about-ecvam/archive-publications/publication/ESAC_Statement_SkinEthic-EpiDerm-FINAL-0812-01.pdf

(23) OCDE (2010). Explanatory Background Document to the OECD Draft Test Guideline on *In Vitro* Skin Irritation Testing. Environment, Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, (No 137), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(24) Katoh, M., Hamajima, F., Ogasawara, T. and Hata K. (2009). Assessment of Human Epidermal Model LabCyte EPI-MODEL for *In Vitro* Skin Irritation Testing According to European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM)-Validated Protocol, *J Toxicol* Sci, 34, 327-334

(25) Katoh, M. and Hata K. (2011). Refinement of LabCyte EPI-MODEL24 Skin Irritation Test Method for Adaptation to the Requirements of OECD Test Guideline 439, *AATEX*, 16, 111-122

(26) OCDE (2011). Validation Report for the Skin Irritation Test Method Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 159), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(27) OCDE (2011). Peer Review Report of Validation of the Skin Irritation Test Using LabCyte EPI-MODEL24. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 155), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(28) Kojima, H., Ando, Y., Idehara, K., Katoh, M., Kosaka, T., Miyaoka, E., Shinoda, S., Suzuki, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, I., Yuasa, A., Watanabe, Y. and Omori, T. (2012). Validation Study of the *In Vitro* Skin Irritation Test with the LabCyte EPI-MODEL24, *Altern Lab Anim*, 40, 33-50.

(29) Welss, T., Basketter, D.A. and Schröder, K.R. (2004). *In Vitro* Skin Irritation: Fact and Future. State of the Art Review of Mechanisms and Models, *Toxicol. In Vitro* 18, 231-243.

(30) Eskes, C. *et al.* (2012). Regulatory Assessment of *In Vitro* Skin Corrosion and Irritation Data within the European Framework: Workshop Recommendations. Regul.*Toxicol*.Pharmacol. 62, 393-403).

(31) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

▼**M8**

(32) EpiSkin™ (February 2009). SOP, Version 1.8ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ Test Method 15 min - 42 hours for the Prediction of acute Skin Irritation of Chemicals

(33) EpiDerm™ (Revised March 2009). SOP, Version 7.0, Protocol for: *In Vitro* EpiDerm™ Skin Irritation Test (EPI-200-SIT), for Use with MatTek Corporation's Reconstructed Human Epidermal Model EpiDerm (EPI-200).

(34) SkinEthic™ RHE (February 2009) SOP, Version 2.0, SkinEthic Skin Irritation Test-42bis Test Method for the Prediction of Acute Skin Irritation of Chemicals: 42 Minutes Application + 42 Hours Post-Incubation.

(35) LabCyte (June 2011). EPI-MODEL24 SIT SOP, Version 8.3, Skin Irritation Test Using the Reconstructed Human Model «LabCyte EPI-MODEL24»

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., and McNamee, P. Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of MTT Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. Manuscript in preparation.

(37) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Mayo de 2001. Available at: [http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf].

(38) Harvell, J.D., Lammintausta, K., Maibach H.I. (1995). Irritant Contact Dermatitis, in: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

(39) EURL-ECVAM (2009). Performance Standards for *In Vitro* Skin Irritation Test Methods Based on Reconstructed Human Epidermis (RhE). *Nota: Esta es la versión actual de las normas de comportamiento del ECVAM, actualizadas en 2009 con vistas a la aplicación del SGA de las Naciones Unidas. Estas normas de comportamiento no deben seguir utilizándose, dado que ahora se dispone de una versión actualizada (8) en relación con las presentes directrices de ensayo.*

(40) EURL ECVAM. (2009). ESAC Statement on the Performance Standards (PS) for *In Vitro* Skin Irritation Testing Using Reconstructed Human Epidermis, Issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC31), 8 July 2009.

(41) CE (2001). Directiva 2001/59/CE de la Comisión, de 6 de agosto de 2001, por la que se adapta, por vigésima octava vez, al progreso técnico la Directiva 67/548/CEE del Consejo relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas (Diario Oficial de la Unión Europea L 225 de 21.8.2001, p. 1).

▼M8

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (9).

**Viabilidad celular**: Parámetro que mide la actividad total de una población celular como, por ejemplo, la capacidad de las deshidrogenasas mitocondriales celulares para reducir el colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo], que, según el parámetro que se mida y el diseño del ensayo realizado, se corresponde con el número total o con la vitalidad de las células vivas.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Concordancia**: Se trata de una medida del comportamiento de los modelos de ensayo que dan un resultado categorial, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «exactitud» se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todos los productos estudiados que se clasifican correctamente como positivos o negativos. La concordancia depende en gran medida de la prevalencia de positivos en los tipos de producto problema que se están examinando (9).

**$TE_{50}$**: Puede estimarse determinando el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad celular en un 50 % tras la administración del producto de referencia a una concentración fija determinada; véase también $CI_{50}$.

**SGA [(Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (ONU)]**: Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

**HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución.

**IATA**: Enfoque integrado de pruebas y evaluación (*Integrated Approach to Testing and Assessment*).

**$CI_{50}$**: Puede estimarse determinando la concentración a la que un producto de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % ($CI_{50}$) tras un tiempo fijo de exposición; véase también $TE_{50}$.

**Dosis excesiva**: Cantidad de producto problema aplicada a la epidermis que supera a la cantidad necesaria para cubrir completa y uniformemente la superficie de la epidermis.

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

**Sustancia de un solo componente**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

▼**M8**

**MTT**: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo.

**Sustancia de componentes múltiples**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

**$NSC_{muerto}$**: Color inespecífico en tejidos muertos.

**$NSC_{vivo}$**: Color inespecífico en tejidos vivos.

**NSMTT**: Reducción inespecífica del MTT.

**Normas de comportamiento**: Normas, basadas en un método de referencia validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (9).

**TP**: Testigo positivo, réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con un producto del que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Pertinencia**: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (9).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (9).

**Ensayo de sustitución**: Ensayo que se diseña para sustituir un ensayo utilizado de forma sistemática y aceptado para la identificación de peligros o la evaluación de riesgos, y del que se ha determinado que proporciona una protección equivalente o mejorada de la salud humana o del medio ambiente, según corresponda, respecto al ensayo aceptado, en relación con todas las situaciones de ensayo y todos los productos posibles (9).

**Tanda**: Una tanda consiste en el ensayo de uno o más productos problema al mismo tiempo que un testigo negativo y un TP.

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos problema activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

▼**M8**

**Irritación cutánea *in vivo***: Formación de una lesión reversible de la piel como consecuencia de la aplicación de un producto durante hasta 4 horas. La irritación cutánea es una reacción que se produce localmente en el tejido cutáneo afectado y aparece poco después de la estimulación (38). Está causada por una reacción inflamatoria local que implica al sistema inmunitario innato (inespecífico) del tejido cutáneo. Su característica principal es consistir en un proceso reversible con presencia de reacciones inflamatorias y la mayoría de los signos clínicos característicos de la irritación (eritema, edema, prurito y dolor) relacionados con un proceso inflamatorio.

**Especificidad**: Proporción de todos los productos negativos o inactivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

**Sustancia**: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**UPLC**: Cromatografía líquida de ultraalta resolución.

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

▼**M8**

*Apéndice 2*

MODELOS DE ENSAYO INCLUIDOS EN ESTE MÉTODO DE ENSAYO

| N.º | Nombre del modelo de ensayo | Tipo de estudio de validación | Referencias |
|---|---|---|---|
| 1 | EpiSkin™ | Estudio de validación prospectivo completo (2003-2007). Los componentes de este modelo se utilizaron para definir los componentes esenciales del método de ensayo de las normas de comportamiento del ECVAM originales y actualizadas (39) (40) (21) (*). Además, los datos del método relativos a la identificación de las sustancias no clasificadas frente a las sustancias clasificadas constituyeron la base principal para definir los valores de especificidad y sensibilidad de las normas de comportamiento originales (*). | (2) (10) (11) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (32) (39) (40) |
| 2 | EpiDerm™ SIT (EPI-200) | EpiDerm™ (*original*): Inicialmente, el modelo de ensayo fue objeto de una validación prospectiva completa junto con el n.º 1 desde 2003-2007. Los componentes de este modelo se utilizaron para definir los componentes esenciales de los métodos de ensayo de las normas de comportamiento del ECVAM originales y actualizadas (39) (40) (21) (*).<br>**EpiDerm™ SIT (EPI-200):** Se validó una modificación del EpiDerm™ original utilizando las normas de comportamiento del ECVAM originales (21) en 2008 (*). (2) (21) (22) (23) (33) | (2) (10) (12) (13) (15) (16) (17) (18) (20) (21) (23) (33) (39) (40) |
| 3 | SkinEthic™ RHE | Estudio de validación basado en las normas de comportamiento del ECVAM originales (21) en 2008 (*) | (2) (21) (22) (23) (31) |
| 4 | LabCyte EPI-MODEL24 SIT | Estudio de validación (2011-2012) basado en las normas de comportamiento de las directrices de ensayo de la OCDE TG 439 (8), basadas en las normas de comportamiento del ECVAM actualizadas (*) (39) (40). | (24) (25) (26) (27) (28) (35) (39) (40) y normas de comportamiento de estas directrices de ensayo (8) (*) |

(*) Las normas de comportamiento del ECVAM originales (21) se desarrollaron en 2007 tras la conclusión del estudio de validación prospectivo (16) que había evaluado el comportamiento de los modelos de ensayo n.os 1 y 2 en relación con el sistema de clasificación descrito en la 28ª modificación de la Directiva sobre sustancias peligrosas de la UE (41). En 2008, se introdujeron el SGA de las Naciones Unidas (1) y el CLP de la UE, desplazando efectivamente el valor umbral para distinguir las sustancias no clasificadas de las clasificadas a partir de una puntuación *in vivo* de 2,0 a 2,3. Para adaptarse a este requisito normativo modificado, se actualizaron en 2009 los valores de la exactitud y la lista de productos de referencia del ECVAM (2) (39) (40). Como las normas de comportamiento originales, también las actualizadas se basaban en gran medida en los datos de los modelos n.os 1 y 2 (16), pero usaban adicionalmente datos sobre los productos de referencia del modelo n.º 3. En 2010, las normas de comportamiento del ECVAM actualizadas se utilizaron para establecer las normas de comportamiento relacionadas con estas directrices de ensayo (8). A efectos del presente método de ensayo, se considera que EpiSkin™ es el MRV, debido a que se utilizó para elaborar todos los criterios de las normas de comportamiento. En el documento explicativo del ECVAM/BfR sobre las correspondientes directrices de ensayo TG 439 de la OCDE (23) puede encontrarse información detallada sobre los estudios de validación, una compilación de los datos generados y los antecedentes de las adaptaciones necesarias de las normas de comportamiento como consecuencia de la aplicación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

SIT: Ensayo de irritación cutánea.

RHE: Epidermis humana reconstruida.

▼M8

*Apéndice 3*

PARÁMETROS DEL PROTOCOLO ESPECÍFICOS DE CADA UNO DE LOS MODELOS DE ENSAYO INCLUIDOS EN ESTE MÉTODO DE ENSAYO

Los modelos de EHR muestran protocolos muy similares y, en particular, todos aplican un período de posincubación de 42 horas (32) (33) (34) (35). Las variaciones se refieren principalmente a tres parámetros relativos a las distintas funciones de barrera de los modelos de ensayo y que figuran en la lista siguiente: A) Tiempo y volumen de preincubación, B) Aplicación de los productos problema y C) Volumen posincubación.

| | EpiSkin™ (SM) | EpiDerm™ SIT (EPI-200) | SkinEthic RHE™ | LabCyte EPI-MODEL24 SIT |
|---|---|---|---|---|
| **A) Preincubación** | | | | |
| Tiempo de incubación | 18-24 horas | 18-24 horas | < 2 horas | 15-30 horas |
| Volumen de medio | 2 ml | 0,9 ml | 0,3 o 1 ml | 0,5 ml |
| **B) Aplicación de los productos problema** | | | | |
| En caso de líquidos | 10 µl (26 µl/cm$^2$) | 30 µl (47 µl/cm$^2$) | 16 µl (32 µl/cm$^2$) | 25 µl (83 µl/cm$^2$) |
| En caso de sólidos | 10 mg (26 mg/cm$^2$) + AD (5 µl) | 25 mg (39 mg/cm$^2$) + DPBS (25 µl) | 16 mg (32 mg/cm$^2$) + AD (10 µl) | 25 mg (83 mg/cm$^2$) + AD (25 µl) |
| Utilización de malla de nailon | No se utiliza | Si es necesaria | Se aplica | No se utiliza |
| Tiempo total de aplicación | 15 minutos | 60 minutos | 42 minutos | 15 minutos |
| Temperatura de aplicación | TA | a) TA durante 25 minutos<br>b) 37°C durante 35 minutos | TA | TA |
| **C) Volumen de posincubación** | | | | |
| Volumen de medio | 2 ml | 0,9 ml x 2 | 2 ml | 1 ml |
| **D) Variabilidad máxima aceptable** | | | | |
| Desviación típica entre réplicas tisulares | DT ≤ 18 | DT ≤ 18 | DT ≤ 18 | DT ≤ 18 |

TA: Temperatura ambiente
AD: Agua destilada
DPBS: Solución salina amortiguadora con fosfato de Dulbecco

▼**M8**

*Apéndice 4*

PARÁMETROS CLAVE Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA CONSIDERAR APTO UN SISTEMA DE ESPECTROFOTOMETRÍA CON HPLC/UPLC PARA LA MEDICIÓN DEL FORMAZANO DE MTT EXTRAÍDO DE TEJIDOS DE EHR

| Parámetro | Protocolo obtenido de las orientaciones de la FDA (36) (37) | Criterios de aceptación |
|---|---|---|
| Selectividad | Análisis de isopropanol, blanco vivo (extracto isopropanólico de tejidos vivos de EHR sin tratamiento), blanco muerto (extracto isopropanólico de tejidos muertos de EHR sin tratamiento) | $Área_{interferencia} \leq 20$ % del $Área_{LIC}$ (1) |
| Precisión | Controles de calidad (es decir, formazano de MTT a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml y 160 µg/ml) en isopropanol (n = 5) | CV ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC |
| Exactitud | Controles de calidad en isopropanol (n = 5) | % Desv ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC |
| Efecto de matriz | Controles de calidad con blanco vivo (n = 5) | 85 % ≤ efecto de matriz ≤ 115 % |
| Efecto residual | Análisis de isopropanol después de un patrón para el LSC (2) | $Área_{interferencia} \leq 20$ % del $Área_{LIC}$ |
| Reproducibilidad (intradiaria) | Tres curvas de calibración independientes (sobre la base de 6 diluciones consecutivas a 1/3 de formazano de MTT en isopropanol, comenzando en el LSC, es decir, 200 µg/ml);<br>Controles de calidad en isopropanol (n = 5) | Curvas de calibración: % Desv ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC<br>Controles de calidad: % Desv ≤ 15 % y CV ≤ 15 % |
| Reproducibilidad (interdiario) | Día 1: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)<br>Día 2: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)<br>Día 3: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) | |
| Estabilidad a corto plazo del formazano de MTT en el extracto de tejido de EHR | Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de 24 horas de conservación a temperatura ambiente | % Desv ≤ 15 % |
| Estabilidad a largo plazo del formazano de MTT en el extracto de tejido de EHR, en caso necesario | Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de varios días de conservación a la temperatura especificada (p.ej., 4°C, -20°C, -80°C) | % Desv ≤ 15 % |

(1) LIC: Límite inferior de cuantificación, definido de forma que cubra una viabilidad tisular del 1-2 %, es decir, 0,8 µg/ml.
(2) LOQ: Límite superior de cuantificación, definido para ser, como mínimo, dos veces superior a la concentración más alta prevista de formazano de MTT en los extractos isopropanólicos de los testigos negativos, es decir, 200 µg/ml.

▼M7

## B.47. MÉTODO DE ENSAYO DE LA OPACIDAD Y PERMEABILIDAD DE LA CÓRNEA DE BOVINO PARA IDENTIFICAR: I) PRODUCTOS QUE PROVOCAN LESIONES OCULARES GRAVES Y II) PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN POR IRRITACIÓN OCULAR NI LESIONES OCULARES GRAVES

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 437 de la OCDE (2013). El método de ensayo de la opacidad y permeabilidad de la córnea de bovino (conocido por la siglas de su nombre en inglés, BCOP), fue evaluado por el Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos estadounidense (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM), junto con el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) y el Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM), en 2006 y 2010 (1)(2). En la primera evaluación, el método de ensayo BCOP se evaluó en cuanto a su utilidad para identificar productos (sustancias y mezclas) que provocan lesiones oculares graves (1). En la segunda evaluación, el método de ensayo BCOP se evaluó en cuanto a su utilidad para identificar productos (sustancias y mezclas) que no están clasificados por irritación ocular ni por lesiones oculares graves (2). La base de datos de validación del método BCOP incluía 113 sustancias y 100 mezclas en total (2)(3). De estas evaluaciones y de su revisión por pares se dedujo que el método de ensayo permite identificar correctamente los productos (tanto sustancias como mezclas) que provocan lesiones oculares graves (categoría 1), así como los que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves, según se definen en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (4) y en el Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) ([1]), por lo que el método se considera científicamente válido para ambos objetivos. Una lesión ocular grave es un daño tisular en el ojo o un deterioro físico importante de la visión, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que no es completamente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación. Los productos problema que provocan lesiones oculares graves se clasifican en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas. Los productos no clasificados por irritación ocular o lesiones oculares graves se definen como aquellos que no cumplen los requisitos para la clasificación en las categorías 1 o 2 (2A o 2B), es decir, se mencionan como «sin categoría» del SGA de las Naciones Unidas. El presente método de ensayo incluye el uso recomendado y las limitaciones del método de ensayo BCOP a partir de sus evaluaciones. Las principales diferencias entre la versión inicial de 2009 y la versión actualizada de 2013 de las líneas directrices de la OCDE se refieren, entre otros, a los siguientes elementos: el uso del método de ensayo BCOP para identificar productos que no requieren clasificación según el SGA de las Naciones Unidas (puntos 2 y 7); aclaraciones sobre la aplicabilidad del método de ensayo BCOP a los ensayos de alcoholes, cetonas y sólidos (puntos 6 y 7) y de sustancias y mezclas (punto 8); aclaraciones sobre cómo deben someterse a ensayo las sustancias tensioactivas y las mezclas que contienen tensioactivos (punto 28); actualizaciones y aclaraciones sobre los testigos positivos (puntos 39 y 40); una actualización de los criterios de decisión del método de ensayo BCOP (punto 48); una actualización de los criterios de aceptación del estudio (punto 49); una actualización de los elementos del informe del ensayo (punto 50); una actualización del apéndice 1, sobre las definiciones; la adición del apéndice 2 sobre la capacidad de predicción del método de ensayo BCOP en diferentes sistemas de clasificación; una actualización del apéndice 3 sobre la lista de productos utilizados para demostrar la aptitud; y una actualización del apéndice 4 sobre el soporte de córnea para el método BCOP (punto 1) y sobre el opacímetro (puntos 2 y 3).

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

Actualmente se reconoce en general que, en un futuro próximo, ningún ensayo de irritación ocular *in vitro* podrá sustituir por sí solo al ensayo ocular de Draize *in vivo* para predecir toda la gama de irritación causada por las distintas categorías de productos. Sin embargo, unas combinaciones estratégicas de varios métodos de ensayo alternativos dentro de una estrategia de ensayos (escalonados) sí podrán sustituir al ensayo ocular de Draize (5). El enfoque descendente (5) está diseñado para utilizarse cuando, sobre la base de la información existente, se espera de un producto que tenga una alta capacidad de irritación, mientras que el enfoque ascendente (5) está diseñado para utilizarse cuando, sobre la base de la información existente, se espera de un producto que no cause irritación ocular suficiente para exigir una clasificación. El método de ensayo BCOP es un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse, en determinadas circunstancias y con limitaciones específicas con fines de clasificación de peligros para los ojos y de etiquetado de productos. Si bien no se considera válido para sustituir por sí solo al ensayo *in vivo* con ojo de conejo, el método de ensayo BCOP se recomienda como fase inicial en una estrategia de ensayo tal como el enfoque descendente sugerido por Scott *et al.* (5) para identificar los productos que provocan lesiones oculares graves, es decir, los productos que han de clasificarse en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas, sin necesidad de hacer más pruebas (4). El método de ensayo BCOP se recomienda también para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves, según se definen en el SGA de las Naciones Unidas (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas) (4) dentro de una estrategia de ensayos como el enfoque ascendente (5). No obstante, un producto del que no se espere que cause lesiones oculares graves o que no esté clasificado por irritación ocular o lesiones oculares graves según el método de ensayo BCOP tendría que someterse a ensayos adicionales (*in vitro* o *in vivo*) para establecer una clasificación definitiva.

El objetivo del presente método de ensayo es describir los procedimientos utilizados para evaluar el posible peligro para los ojos de un producto problema en función de su capacidad para inducir opacidad y aumento de la permeabilidad en una córnea aislada de bovino. Los efectos tóxicos para la córnea se miden mediante: i) el descenso de la transmisión luminosa (opacidad), y ii) el aumento del paso del pigmento fluoresceína sódica (permeabilidad). Los resultados de la evaluación de la opacidad y de la permeabilidad de la córnea tras su exposición al producto problema se combinan para obtener una puntuación de la capacidad de irritación *in vitro* (conocida por sus siglas en inglés, IVIS), que se utiliza para clasificar el nivel de capacidad de irritación del producto problema.

En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

El presente método de ensayo se basa en el protocolo del método de ensayo BCOP del ICCVAM (6)(7), que fue elaborado originariamente a partir del protocolo del Institute for *in vitro* Sciences (IIVS) y del protocolo 124 de INVITTOX (8). Este último representa el protocolo utilizado en el estudio de prevalidación patrocinado por la Comunidad Europea y realizado en 1997-1998. Estos dos protocolos se basaban en el método de ensayo BCOP comunicado por primera vez por Gautheron *et al*. (9).

El método de ensayo BCOP puede utilizarse para identificar los productos que provocan lesiones oculares graves, tal como se definen en el SGA de las Naciones Unidas, es decir, que deben clasificarse como productos de la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas (4). Cuando se utiliza para este fin, el método de ensayo BCOP tiene una exactitud general del 79 % (150/191), una tasa de falsos positivos del 25 % (32/126), y una tasa de falsos negativos del 14 % (9/65), cuando se compara con los datos del método de ensayo *in vivo* con ojo de conejo, clasificados según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas (3) (véase el apéndice 2, cuadro 1). Cuando los productos problema de ciertas clases químicas (en concreto, alcoholes y cetonas) o físicas (en concreto, sólidos), se excluyen de la base de datos, el método de ensayo BCOP tiene una

▼M7

exactitud general del 85 % (111/131), una tasa de falsos positivos del 20 % (16/81), y una tasa de falsos negativos del 8 % (4/50) para el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas (3). Las posibles deficiencias del método de ensayo BCOP para identificar los productos que provocan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas) están relacionadas con la elevada tasa de falsos positivos de alcoholes y cetonas y la elevada tasa de falsos negativos de sólidos, observadas en la base de datos de validación (1)(2)(3). Sin embargo, dado que no todos los alcoholes y cetonas dan resultados positivos excesivos (sobrepredicción) por el método de ensayo BCOP y algunos de ellos se asignan correctamente a la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas, estos dos grupos funcionales orgánicos no se consideran fuera del ámbito de aplicación del método de ensayo. Corresponde al usuario del método de ensayo decidir si puede aceptarse una posible sobrepredicción de un alcohol o cetona, o si deben efectuarse más ensayos con un planteamiento basado en la ponderación de las pruebas. En relación con las tasas de falsos negativos de sólidos, cabe señalar que los sólidos pueden dar lugar a condiciones de exposición variables y extremas en el ensayo *in vivo* de irritación de Draize, lo cual puede derivar en resultados poco pertinentes sobre el verdadero potencial de irritación (10). También debe señalarse que ninguno de los falsos negativos detectados en la base de datos de validación del ICCVAM (2)(3), en el contexto de la identificación de los productos que inducen lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas), dio lugar a una IVIS ≤ 3, que es el criterio utilizado para identificar un producto problema como sin categoría del SGA de las Naciones Unidas. Además, los falsos negativos del BCOP no son fundamentales en este contexto, ya que todos los productos problema que den 3 < IVIS ≤ 55 se someterían posteriormente a otros ensayos *in vitro* validados adecuadamente, o como última opción con conejos, en función de las exigencias normativas, utilizando una estrategia de ensayo secuencial en un enfoque de ponderación de las pruebas. Teniendo en cuenta que algunos productos sólidos son clasificados adecuadamente por el método de ensayo BCOP como de la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas, tampoco se considera que este estado físico quede fuera del ámbito de aplicación del método de ensayo. Los investigadores pueden considerar la posibilidad de utilizar este método de ensayo con todos los tipos de productos, aceptándose una IVIS > 55 como indicativa de una respuesta que provoca lesiones oculares graves, con lo que el producto se clasificaría en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas sin ensayos adicionales. Sin embargo, como se ha mencionado antes, los resultados positivos obtenidos con alcoholes o cetonas deben interpretarse con precaución, debido al riesgo de sobrepredicción.

El método de ensayo BCOP puede utilizarse también para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves con arreglo al sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas (4). Cuando se utiliza para este fin, el método de ensayo BCOP tiene una exactitud general del 69 % (135/196), una tasa de falsos positivos del 69 % (61/89), y una tasa de falsos negativos del 0 % (0/107), cuando se compara con los datos del método de ensayo *in vivo* con ojo de conejo, clasificados según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas (3) (véase el apéndice 2, cuadro 2). La tasa de falsos positivos obtenida (productos sin categoría del SGA de las Naciones Unidas *in vivo* que presentan una IVIS > 3, véase el punto 48) es considerablemente elevada, pero no es crítica en este contexto, ya que todos los productos problema que den 3 < IVIS ≤ 55 se someterían posteriormente a otros ensayos *in vitro* validados adecuadamente, o como última opción con conejos, en función de las exigencias normativas, utilizando una estrategia de ensayo secuencial en un enfoque de ponderación de las pruebas. El método de ensayo BCOP no presenta deficiencias específicas para el ensayo de alcoholes, cetonas y sólidos cuando el objetivo es identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas) (3). Los investigadores pueden considerar la posibilidad de utilizar este método de ensayo con todos los tipos de productos, aceptándose un resultado negativo (IVIS ≤ 3) como indicativo de que no se requiere clasificación (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas). Dado que el método de ensayo BCOP solo puede identificar correctamente el 31 % de los productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves, este método de ensayo no debe ser la primera opción para iniciar un enfoque ascendente (5), si se dispone de otros métodos *in vitro* validados y aceptados, con gran sensibilidad similar pero mayor especificidad.

▼M7

La base de datos de validación del método BCOP incluía 113 sustancias y 100 mezclas en total (2)(3). El método de ensayo BCOP se considera, por tanto, aplicable a los ensayos de sustancias y de mezclas.

El método de ensayo BCOP no se recomienda para la identificación de productos problema que deben clasificarse como irritantes oculares (categoría 2 o categoría 2A del SGA de las Naciones Unidas) o de productos problema que deben clasificarse como moderadamente irritantes para los ojos (categoría 2B del SGA de las Naciones Unidas) debido al considerable número de productos de la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas clasificados de forma insuficiente en las categorías 2, 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas y productos sin categoría del SGA de las Naciones Unidas clasificados de forma excesiva en las categorías 2, 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas (2) (3). A tal fin, pueden resultar necesarias pruebas adicionales con otro método adecuado.

Todos los procedimientos con ojos de bovino y córneas de bovino deben ajustarse a las normas y procedimientos aplicables de la instalación de ensayo en relación con la manipulación de materiales derivados de animales, entre los que figuran los tejidos o los líquidos tisulares. Se recomienda observar las precauciones universales de laboratorio (11).

Si bien el método de ensayo BCOP no tiene en cuenta las lesiones de la conjuntiva y del iris, sí atiende a los efectos en la córnea, que son un factor de primer orden de la clasificación *in vivo* cuando se considera la clasificación del SGA de las Naciones Unidas. La reversibilidad de las lesiones de la córnea no puede evaluarse *per se* en el método de ensayo BCOP. Se ha propuesto, según estudios realizados con ojo de conejo, que se utilice una evaluación de la profundidad inicial de la lesión de la córnea para identificar algunos tipos de efectos irreversibles (12). Sin embargo, se necesitan más conocimientos científicos para comprender cómo se dan efectos irreversibles no relacionados con lesiones iniciales de alto nivel. Finalmente, el método de ensayo BCOP no permite la evaluación del potencial de toxicidad sistémica asociado con la exposición ocular.

El presente método de ensayo se actualizará periódicamente a la luz de la nueva información y los datos que se vayan considerando. Por ejemplo, la histopatología puede ser útil si se necesita una caracterización más completa de las lesiones de la córnea. Como se indica en el documento de orientación de la OCDE n.º 160 (13), se insta a los usuarios a conservar las córneas y a preparar muestras de histopatología que puedan utilizarse para compilar una base de datos y criterios de decisión con los que se pueda mejorar más tarde la exactitud de este método.

Cuando algún laboratorio establezca inicialmente este método de ensayo, deben utilizarse los productos para demostrar la aptitud que se indican en el apéndice 3. Los laboratorios pueden utilizar estos productos para demostrar su competencia técnica en la realización del método de ensayo BCOP antes de presentar, con fines de clasificación normativa de peligro, los datos obtenidos con este ensayo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método de ensayo BCOP es un modelo organotípico con mantenimiento a corto plazo del funcionamiento fisiológico y bioquímico normal de la córnea de bovino *in vitro*. En este método de ensayo, la lesión provocada por el producto problema se evalúa mediante la medición cuantitativa de los cambios producidos en la opacidad y en la permeabilidad de la córnea, utilizando un opacímetro y un espectrofotómetro de luz visible, respectivamente. Las dos mediciones se combinan para calcular la IVIS, que se utiliza para asignar una categoría de clasificación de peligro por irritación *in vitro* a fin de predecir el potencial de irritación ocular *in vivo* de un producto problema (véanse los criterios de decisión en el punto 48).

El método de ensayo BCOP utiliza córneas aisladas de ojos de ganado bovino recién sacrificado. La opacidad de la córnea se mide cuantitativamente como cantidad de luz transmitida a través de la córnea. La permeabilidad se mide cuantitativamente como cantidad del pigmento fluoresceína sódica que atraviesa todo el espesor de la córnea y se detecta así en el medio que se encuentra en la

▼M7

cámara posterior. Los productos problema se aplican a la superficie epitelial de la córnea poniéndolos en la cámara anterior del soporte de córnea. En el apéndice 4 se ofrece una descripción y un diagrama de un soporte de córnea utilizado en el método de ensayo BCOP. Los soportes de córnea pueden obtenerse de diferentes fuentes comerciales o bien construirse en el propio laboratorio.

**Fuente y edad de los ojos de bovino y selección de la especie animal**

El ganado bovino enviado a los mataderos se sacrifica normalmente para el consumo humano o con otros fines comerciales. Como fuente de córneas para el método de ensayo BCOP se utilizan solo animales sanos que se consideren adecuados para entrar en la cadena alimentaria humana. Debido a que el ganado bovino presenta una amplia variedad de peso, en función de la raza, edad y sexo, no se recomienda ningún peso concreto del animal en el momento del sacrificio.

Puede variar el tamaño de la córnea cuando se utilizan ojos de animales de distintas edades. Las córneas con un diámetro horizontal > 30,5 mm y un espesor central de la córnea (ECC) ≥ 1 100 μm suelen obtenerse de animales de más de ocho años, mientras que las córneas con un diámetro horizontal < 28,5 mm y un ECC < 900 μm suelen proceder de animales de menos de cinco años (14). Por este motivo, no suelen utilizarse ojos de animales de más de sesenta meses de edad. Tradicionalmente no se utilizan tampoco ojos de animales de menos de doce meses, ya que estos ojos están aún en fase de desarrollo y el espesor y el diámetro de su córnea son considerablemente más pequeños que los observados en ojos de bovinos adultos. Sin embargo, es admisible el uso de córneas de animales jóvenes (es decir, de entre seis y doce meses de edad) porque presentan ciertas ventajas, como una mayor disponibilidad, una variabilidad pequeña en cuanto a la edad, y un peligro reducido en cuanto a la posible exposición de los trabajadores a la encefalopatía espongiforme bovina (15). Como puede ser útil una evaluación más completa del efecto del tamaño o del espesor de la córnea sobre la sensibilidad ante productos corrosivos e irritantes, se anima a los usuarios a informar sobre la edad o el peso estimados de los animales de los que proceden las córneas utilizadas en un estudio.

**Recogida y transporte de los ojos al laboratorio**

Los ojos son recogidos por los empleados del matadero. Para minimizar las lesiones de los ojos, de tipo mecánico u otro, hay que enuclear los ojos tan pronto como sea posible tras la muerte y enfriarlos inmediatamente después de la enucleación y durante el transporte. A fin de evitar la exposición de los ojos a productos potencialmente irritantes, los empleados del matadero no deben utilizar detergentes cuando laven la cabeza del animal.

Los ojos deben sumergirse completamente en solución salina equilibrada de Hank (conocida por sus siglas en inglés, HBSS) refrigerada en un recipiente de tamaño adecuado, y transportarse al laboratorio de manera que se reduzcan al mínimo su deterioro y su contaminación bacteriana. Como los ojos se recogen durante el proceso de sacrificio, pueden estar expuestos a la sangre y a otros materiales biológicos, además de bacterias y otros microorganismos. Por tanto, es importante velar por que se reduzca al mínimo el riesgo de contaminación (por ejemplo, manteniendo en hielo el recipiente con los ojos durante las operaciones de recogida y transporte, y añadiendo antibióticos a la HBSS utilizada para conservar los ojos durante el transporte [por ejemplo, 100 UI/ml de penicilina y 100 μg/ml de estreptomicina]).

Debe reducirse al mínimo el tiempo transcurrido entre la recogida de los ojos y la utilización de las córneas en el método de ensayo BCOP (lo normal es efectuar todo el proceso en un solo día), y hay que demostrar que ese tiempo no altera los resultados del ensayo. Estos resultados se basan en los criterios de selección de los ojos, así como en las respuestas obtenidas con testigos positivos y negativos. Todos los ojos utilizados en el ensayo deben proceder del mismo grupo de ojos recogidos un día concreto.

**Criterios de selección de los ojos utilizados en el método de ensayo BCOP**

Tras su llegada al laboratorio, los ojos se someten a un atento examen para detectar posibles defectos, como un aumento de la opacidad, arañazos o neovascularización. Solo deben utilizarse las córneas de ojos que no presenten estos defectos.

▼M7

La calidad de cada córnea se evalúa también en otras fases posteriores del ensayo. Deben desecharse las córneas que tengan una opacidad mayor de siete unidades de opacidad o equivalente según el opacímetro y los soportes de córneas que se hayan usado con ellas después del período inicial de equilibrado de una hora (*NOTA:* El opacímetro debe calibrarse con los patrones de opacidad utilizados para establecer las unidades de opacidad, véase el apéndice 4).

Cada grupo de tratamiento (producto problema, testigos negativos y positivos en paralelo) consiste en un mínimo de tres ojos. Para el testigo negativo en el método de ensayo BCPO deben utilizarse tres córneas. Puesto que todas las córneas se extraen del globo entero y se montan en las cámaras de córnea, existe la posibilidad de que haya artefactos procedentes de la manipulación que influyan en los distintos valores de opacidad y permeabilidad de la córnea (incluido el testigo negativo). Por otra parte, los valores de opacidad y permeabilidad de las córneas del testigo negativo se utilizan para corregir los valores de opacidad y permeabilidad de las córneas tratadas con la muestra problema y con los testigos positivos a efectos del cálculo de la IVIS.

PROCEDIMIENTO

**Preparación de los ojos**

Se disecan córneas libres de defectos, dejándoles un borde de 2 o 3 mm de esclerótica para facilitar la manipulación posterior, y atendiendo a no lesionar el epitelio ni el endotelio de la córnea. Las córneas aisladas se montan en soportes de córnea, diseñados especialmente, que consisten en un compartimento anterior y otro posterior, en contacto respectivamente con el lado epitelial y el lado endotelial de la córnea. Ambas cámaras se llenan hasta rebosar con medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) sin rojo de fenol y precalentado, empezando por la cámara posterior y evitando la formación de burbujas. El dispositivo se estabiliza después a 32 ± 1 °C durante al menos una hora para que las córneas alcancen un estado de equilibrio con el medio y consigan una actividad metabólica normal, dentro de lo posible (la temperatura aproximada de la superficie de la córnea *in vivo* es de 32 °C).

Tras el periodo de equilibrado, se añade a ambas cámaras nuevo EMEM sin rojo de fenol y precalentado, y se toman lecturas de la opacidad de base de cada córnea. Deben desecharse las córneas que muestren lesiones tisulares macroscópicas (p. ej., arañazos, pigmentación, neovascularización) o una opacidad mayor de siete unidades de opacidad o equivalente según el opacímetro y los soportes de córneas que se hayan usado. Se selecciona para el testigo negativo (o de disolvente) un mínimo de tres córneas. El resto de las córneas se distribuye después en grupos de tratamiento y de testigo positivo.

Como la capacidad térmica del agua es superior a la del aire, el agua ofrece condiciones de temperatura más estables para la incubación. Por tanto, se recomienda utilizar un baño de agua para mantener los soportes de córnea y su contenido a 32 ± 1 °C. Sin embargo, también pueden utilizarse incubadoras de aire, si se toman precauciones para mantener la estabilidad de la temperatura (por ejemplo, precalentando los soportes y los medios).

**Aplicación del producto problema**

Se utilizan dos protocolos de tratamiento diferentes, uno para líquidos y agentes tensioactivos (sólidos o líquidos) y otro para sólidos que no son agentes tensioactivos.

Los líquidos se someten al ensayo sin diluir. Los semisólidos, cremas y ceras se someten a ensayo en principio como líquidos. Las sustancias tensioactivas sin diluir se someten a ensayo a una concentración del 10 % (p/v) en solución de cloruro sódico al 0,9 %, agua destilada u otro disolvente del que se haya demostrado que no tiene efectos negativos sobre el sistema de ensayo. Debe justificarse adecuadamente si se utilizan otras concentraciones de dilución. Las mezclas que contengan tensioactivos pueden someterse a ensayo sin diluir o diluidas a una

▼M7

concentración adecuada en función del escenario de exposición *in vivo* pertinente. Debe justificarse adecuadamente la concentración utilizada en el ensayo. Las córneas se exponen a los líquidos y agentes tensioactivos durante 10 minutos. La utilización de otros tiempos de exposición exige una explicación científica adecuada. Véase en el apéndice 1 una definición de tensioactivo y de mezcla que contiene tensioactivos.

Los sólidos que no son agentes tensioactivos se someten a ensayo en principio como soluciones o suspensiones a una concentración del 20 % (p/v) en solución de cloruro sódico al 0,9 %, agua destilada u otro disolvente del que se haya demostrado que no tiene efectos negativos sobre el sistema de ensayo. En ciertas circunstancias y con una justificación científica adecuada, es posible someter a ensayo los sólidos sin diluir mediante aplicación directa sobre la superficie de la córnea, utilizando el método de cámara abierta (véase el punto 32). Las córneas se exponen a los sólidos durante cuatro horas, pero, como sucede con los líquidos y agentes tensioactivos, es posible utilizar otros tiempos de exposición si se cuenta con una explicación científica adecuada.

Pueden utilizarse distintos métodos de tratamiento, en función de la naturaleza física y de las características químicas del producto problema (por ejemplo, sólidos, líquidos, líquidos viscosos frente a líquidos no viscosos). El factor crítico consiste en velar por que el producto problema cubra adecuadamente la superficie epitelial y se elimine adecuadamente durante las fases de lavado. Suele utilizarse un método de cámara cerrada cuando se estudian productos problema líquidos desde no viscosos hasta ligeramente viscosos, mientras que se usa en principio un método de cámara abierta con productos problema líquidos viscosos y semiviscosos, así como con sólidos sin diluir.

En el método de cámara cerrada, se introduce en la cámara anterior (a través de los orificios de administración que se encuentran en la superficie superior de la cámara) una cantidad suficiente de producto problema (750 µl) para cubrir la cara epitelial de la córnea, y los agujeros se tapan a continuación con los tapones de la cámara durante la exposición. Es importante que cada córnea quede expuesta al producto problema durante el periodo adecuado.

En el método de cámara abierta, antes del tratamiento se retiran el anillo de cierre de la ventana y la ventana de cristal de la cámara anterior. El producto problema o testigo (750 µl, o una cantidad suficiente de producto problema para cubrir completamente la córnea) se aplica directamente sobre la superficie epitelial de la córnea utilizando una micropipeta. Si es difícil pipetear el producto problema, este puede cargarse a presión en una pipeta de desplazamiento positivo para facilitar la dosificación. La punta de pipeta de la pipeta de desplazamiento positivo se inserta en la punta de dispensación de la jeringa, de forma que el producto problema pueda cargarse en la punta de desplazamiento bajo presión. Simultáneamente, se oprime el émbolo de la jeringa mientras se arrastra hacia arriba el pistón de la pipeta. Si aparece alguna burbuja de aire en la punta de la pipeta, se retira (se expulsa) el producto problema y se repite el proceso hasta que la punta se quede llena sin ninguna burbuja de aire. En caso necesario, puede utilizarse una jeringa normal (sin aguja), ya que permite medir un volumen exacto de producto problema y facilita su aplicación sobre la superficie epitelial de la córnea. Tras la aplicación del producto, se vuelve a colocar la ventana de cristal de la cámara anterior para crear de nuevo un sistema cerrado.

**Incubación tras la exposición**

Tras el periodo de exposición, el producto problema, el testigo negativo o el producto de testigo positivo se retiran de la cámara anterior y se lava el epitelio al menos tres veces (o hasta que no quede ningún rastro visible del producto problema) utilizando EMEM con rojo de fenol. Se utiliza para el lavado el medio con rojo de fenol porque la observación del cambio de color de esta sustancia permite determinar la efectividad del lavado de productos problema ácidos o

▼M7

alcalinos. Las córneas se lavan más de tres veces si el rojo de fenol sigue sin colorearse (amarillo o púrpura) o sigue viéndose el producto problema. Una vez el medio ha quedado libre de producto problema, se lavan las córneas una última vez con EMEM sin rojo de fenol. Se utiliza EMEM sin rojo de fenol en el lavado final para eliminar el rojo de fenol de la cámara anterior antes de medir la opacidad. La cámara anterior vuelve a llenarse a continuación con EMEM nuevo sin rojo de fenol.

En el caso de líquidos o agentes tensioactivos, las córneas, una vez lavadas, se incuban otras dos horas a 32 ± 1 °C. En ciertas circunstancias puede ser útil prolongar este tiempo tras la exposición, extremo que debe estudiarse en cada caso. Las córneas tratadas con sólidos se lavan a fondo al final del periodo de exposición de cuatro horas, pero no es necesario prolongar su incubación.

Al final del periodo de incubación tras la exposición en el caso de líquidos y agentes tensioactivos y al final del periodo de exposición de cuatro horas en el caso de sólidos que no son agentes tensioactivos, se registran la opacidad y la permeabilidad de cada córnea. Asimismo, se observa visualmente cada córnea y se registran las observaciones pertinentes (por ejemplo, abrasión tisular, producto problema residual, opacidad no uniforme). Estas observaciones pueden ser importantes ya que pueden reflejarse en variaciones de las lecturas del opacímetro.

**Productos testigo**

En cada experimento se incluyen testigos simultáneos negativos (o del disolvente/vehículo) y positivos.

Cuando se somete a ensayo una sustancia líquida al 100 %, se incluye en el método de ensayo BCOP un testigo negativo en paralelo (por ejemplo, solución de cloruro sódico al 0,9 % o agua destilada), de forma que puedan detectarse los eventuales cambios inespecíficos del sistema de ensayo y se disponga de una base de referencia para los parámetros del ensayo. También permite asegurarse de que las condiciones del ensayo no provocan de forma inadecuada una respuesta de irritación.

Cuando se somete a ensayo una sustancia líquida diluida, un agente tensioactivo o un sólido, se incluye en el método de ensayo BCOP un grupo de testigo en paralelo del disolvente/vehículo, de forma que puedan detectarse los eventuales cambios inespecíficos del sistema de ensayo y se disponga de una base de referencia para los parámetros del ensayo. Solo pueden utilizarse disolventes/vehículos de los que se haya demostrado que carecen de efectos adversos sobre el sistema de ensayo.

Un producto del que se sabe que induce una respuesta positiva se incluye como testigo positivo en paralelo en cada experimento para verificar la integridad del sistema de ensayo y su correcta realización. Sin embargo, para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta de irritación.

Como ejemplos de testigos positivos para productos problema líquidos se pueden citar el etanol al 100 % y la dimetilformamida al 100 %. Un ejemplo de testigo positivo para productos problema sólidos es el imidazol al 20 % (p/v) en solución de cloruro sódico al 0,9 %.

Es útil disponer de productos de referencia para evaluar el potencial de irritación ocular de productos desconocidos dentro de una clase específica de productos, o para evaluar la capacidad de irritación relativa de un irritante ocular dentro de una gama específica de respuestas de irritación.

**Parámetros medidos**

La opacidad se determina mediante la cantidad de luz transmitida a través de la córnea. La opacidad de la córnea se mide cuantitativamente con ayuda de un opacímetro, que permite medir los valores de opacidad en una escala continua.

La permeabilidad se determina por la cantidad del pigmento fluoresceína sódica que penetra en todas las capas de células de la córnea (es decir, desde el epitelio de la superficie exterior de la córnea hasta el endotelio de su superficie interior). Se añade a la cámara anterior del soporte de córnea 1 ml de solución de fluoresceína sódica (4 o 5 mg/ml cuando se estudian líquidos y agentes tensioactivos o sólidos no tensioactivos, respectivamente), en contacto con el lado epitelial de

▼M7

la córnea, mientras que la cámara posterior, en contacto con el lado endotelial de la córnea, se llena con EMEM nuevo. El soporte se incuba a continuación en posición horizontal durante 90 ± 5 min a 32 ± 1 °C. La cantidad de fluoresceína sódica que atraviesa la córnea hasta la cámara posterior se mide cuantitativamente mediante espectrofotometría UV/VIS. Las mediciones espectrofotométricas evaluadas a 490 nm se registran como valores de absorbancia o densidad óptica (DO490), medidos en una escala continua. Los valores de permeabilidad a la fluoresceína se determinan utilizando los valores de DO490 conseguidos mediante un espectrofotómetro de luz visible con un camino óptico normal de 1 cm.

También puede utilizarse un lector de placa de microvaloración de 96 pocillos siempre que: i) pueda establecerse la banda de linealidad del lector de placas para determinar los valores de DO490 de fluoresceína; y ii) se utilice el volumen correcto de muestras de fluoresceína en la placa de 96 pocillos para obtener unos valores de DO490 equivalentes a los conseguidos con un camino óptico normal de 1 cm [esto puede exigir que los pocillos estén completamente llenos (generalmente, 360 l)].

DATOS E INFORME

**Evaluación de los datos**

Una vez corregidos los valores de opacidad y de permeabilidad media (DO490) para tener en cuenta los valores de opacidad de fondo y de permeabilidad (DO490) del testigo negativo, los valores medios de opacidad y permeabilidad (DO490) se combinan en una fórmula empírica para calcular la puntuación de la capacidad de irritación *in vitro* (IVIS) de cada grupo de tratamiento, de la manera siguiente:

IVIS = valor medio de opacidad + [15 × valor medio de permeabilidad (DO490)]

Sina *et al*. (16) comunican que esta fórmula se ha obtenido mediante estudios internos e interlaboratorios. Los datos obtenidos con una serie de 36 compuestos en un estudio interlaboratorios se sometieron a análisis con múltiples variables para determinar la ecuación que se ajustara mejor a los datos *in vivo* e *in vitro*. Los científicos de dos empresas distintas realizaron este análisis y llegaron a ecuaciones casi idénticas.

Los valores de opacidad y permeabilidad deben evaluarse también independientemente para determinar si un producto problema ha inducido corrosividad o irritación intensa mediante solo uno de los dos parámetros (véase la parte siguiente, sobre criterios de decisión).

**Criterios de decisión**

Los valores de corte de la IVIS para la identificación de productos problema que provocan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas) y productos problema que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas) figuran a continuación:

| IVIS | SGA de las Naciones Unidas |
|---|---|
| ≤ 3 | Sin categoría |
| > 3; ≤ 55 | No se puede predecir |
| ≤ 55 | Categoría 1 |

**Criterios de aceptación del estudio**

Se considera que un ensayo es aceptable si el testigo positivo da una IVIS comprendida en el intervalo de dos desviaciones típicas respecto a la media histórica del momento, que debe actualizarse al menos cada tres meses, o cada vez que se efectúe un ensayo aceptable en caso de laboratorios en los que no sea frecuente efectuar estos ensayos (es decir, con una frecuencia que no llegue a mensual). Las respuestas de los testigos negativos o del disolvente/vehículo deben llevar a unos valores de opacidad y permeabilidad inferiores a los límites superiores establecidos para los valores de opacidad y permeabilidad de fondo de las córneas de bovino tratadas con el respectivo testigo negativo o del disolvente/vehículo. Una sola tanda de ensayos, formada al menos por tres córneas, debería

▼M7

ser suficiente para un producto problema, si la clasificación resultante es inequívoca. Sin embargo, en casos de resultados dudosos en la primera tanda de ensayos, debe considerarse la realización de una segunda tanda de ensayos (aunque no sea necesariamente obligatoria), así como la de una tercera en caso de resultados medios de IVIS discordantes entre las dos primeras series de pruebas. En este contexto, un resultado de la primera tanda de ensayos se considera dudoso si las predicciones obtenidas de las tres córneas no concuerdan, de forma que:

— dos de las tres córneas dan predicciones discordantes respecto a la media de las tres córneas, O BIEN

— una de las tres córneas da una predicción discordante de la media de las tres córneas, Y el resultado discordante > 10 unidades de IVIS respecto al umbral de corte de 55.

— Si la tanda de ensayos repetida corrobora la predicción de la primera tanda de ensayos (según el valor medio de la IVIS), puede tomarse una decisión final sin ensayos adicionales. Si el resultado de la tanda de ensayos repetida es una predicción no concordante con la tanda de ensayos inicial (según el valor medio de la IVIS), entonces debe hacerse una tercera y última tanda de ensayos, con el fin de resolver las predicciones dudosas y clasificar el producto problema. No será necesario realizar nuevas pruebas con vistas a la clasificación y etiquetado en caso de que alguna tanda de ensayos resulte en una predicción de categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas.

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la siguiente información, en caso de que corresponda a la realización del estudio:

*Productos problema y testigo*

— Denominación o denominaciones químicas, como la denominación estructural utilizada por el Chemical Abstracts Service (CAS), seguida por otras denominaciones, si se conocen; número de registro CAS, si se conoce;

— pureza y la composición del producto problema/testigo (en porcentajes en peso), en la medida en que se disponga de esta información;

— propiedades físico-químicas pertinentes para la realización del estudio, como estado físico, volatilidad, pH, estabilidad, clase química o hidrosolubilidad;

— tratamiento de los productos problema y testigo antes del ensayo, en su caso (por ejemplo, calentamiento, trituración);

— estabilidad, si se conoce.

*Información referente al promotor y al laboratorio*

— Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio.

*Condiciones del método de ensayo*

— Opacímetro utilizado (por ejemplo, modelo y especificaciones) y configuración del instrumento;

— información sobre la calibración de los dispositivos utilizados para medir la opacidad y la permeabilidad (por ejemplo, opacímetro y espectrofotómetro) para garantizar la linealidad de las mediciones;

— tipo de los soportes de córnea utilizados (por ejemplo, modelo y especificaciones);

▼M7

— descripción de otros equipos utilizados;

— procedimiento utilizado para garantizar la integridad (es decir, la exactitud y la fiabilidad) del método de ensayo a lo largo del tiempo (por ejemplo, ensayo periódico de productos de la prueba de aptitud).

*Criterios de aceptabilidad del ensayo*

— Bandas aceptables de testigos positivos y negativos en paralelo según los datos anteriores;

— cuando corresponda, bandas aceptables de testigos de referencias simultáneos según los datos anteriores.

*Recogida y preparación de los ojos*

— Identificación de la fuente de los ojos (es decir, instalación en la que se han recogido);

— diámetro de la córnea como medida de la edad del animal del que procede y de la adecuación para el ensayo;

— condiciones de almacenamiento y transporte de los ojos (por ejemplo, fecha y hora de recogida de los ojos, plazo transcurrido hasta el inicio del ensayo, medios de transporte y condiciones de temperatura, uso eventual de antibióticos);

— preparación y montaje de las córneas de bovino, con inclusión de declaraciones sobre su calidad, la temperatura de los soportes de córnea y criterios de selección de las córneas utilizadas para los ensayos.

*Procedimiento*

— Número de réplicas utilizadas;

— identidad de los testigos positivos y negativos utilizados (en su caso, también los testigos de disolvente y de referencia);

— concentración o concentraciones del producto problema, aplicación, tiempo de exposición y tiempo de incubación tras la exposición utilizados;

— Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;

— Descripción de los criterios de aceptación del estudio seguidos;

— descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;

— descripción de los criterios de decisión seguidos.

*Resultados*

— Presentación en forma de cuadro de los datos correspondientes a las distintas muestras problema (por ejemplo, valores de opacidad y DO490 e IVIS calculada para el producto problema y los testigos positivos, negativos y de referencia [si se utilizan], incluidos los datos procedentes de los experimentos repetidos en paralelo cuando corresponda, y las medias ± la desviación típica de cada experimento);

— Descripción de otros efectos observados.

— la clasificación del SGA de las Naciones Unidas obtenida *in vitro*, si procede.

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

▼**M7**

BIBLIOGRAFÍA

(1) ICCVAM (2006). Test Method Evaluation Report — *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. NIH Publication No.10-7553. Research Triangle Park, NC:National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(3) OCDE (2013). Streamlined Summary Document supporting the Test Guideline 437 for eye irritation/corrosion. Series on Testing and Assessment, No.189, OECD, Paris.

(4) Naciones Unidas (2011). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA), ST/SG/AC.10/30, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra: Naciones Unidas. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_s.html.

(5) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., and Zuang, V. (2010). A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches. *Toxicol. in Vitro* 24:1-9.

(6) ICCVAM (2006). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — *in vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(7) ICCVAM (2010). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Validation Status of *In Vitro* Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponible en: http://
iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(8) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay — SOP of Microbiological Associates Ltd. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

(9) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.

(10) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? *Toxicol. in Vitro* 20:78-81.

(11) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible en: [http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

▼**M7**

(12) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(13) OCDE (2011). Guidance Document on The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-severe Irritants. Series on Testing and Assessment, No. 160. Adopted October 25, 2011. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.

(15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on — Part I. The Lancet 349: 636-641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam. Appl. Toxicol.* 26:20-31.

(17) Capítulo B.5 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.

(18) ICCVAM (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible en: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) OCDE (1998). Series on Good Laboratory Practice and Compliance Monitoring. No. 1: OECD Principles on Good Laboratory Practice (revised in 1997).

Disponible en: http://www.oecd.org/document/63/0,3343,en_2649_34381_2346175_1_1_1_1,00.html

▼**M7**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su «pertinencia». Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo.

**Producto de referencia**: Producto utilizado como patrón para comparar con un producto problema. Los productos de referencia deben presentar las siguientes propiedades: i) un origen coherente y fiable; ii) similitud estructural y funcional con la clase de productos problema; iii) características físicas y químicas conocidas; iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

**Planteamiento ascendente**: Enfoque gradual utilizado para un producto del que se sospecha que no requiere clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que no requieren clasificación (resultado negativo) frente a otros productos (resultado positivo).

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Córnea**: Parte transparente delantera del globo ocular que cubre el iris y la pupila y permite el paso de la luz al interior.

**Opacidad de la córnea**: Medida del grado de opacidad de la córnea tras su exposición a un producto problema. Un aumento de la opacidad de la córnea indica que esta ha sufrido una lesión. La opacidad puede evaluarse subjetivamente, como se hace en el ensayo con ojo de conejo de Draize, u objetivamente con un instrumento como un «opacímetro».

**Permeabilidad de la córnea**: Medida cuantitativa de la lesión del epitelio corneal mediante determinación de la cantidad del pigmento fluoresceína sódica que pasa a través de todas las capas de células corneales.

**Irritación ocular**: Producción de cambios en el ojo, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que son totalmente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con «efectos reversibles en el ojo» y con «categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas» (4).

**Tasa de falsos negativos**: Proporción de todos los productos positivos identificados erróneamente como negativos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Tasa de falsos positivos**: Proporción de todos los productos negativos identificados erróneamente como positivos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Peligro**: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**Puntuación de la capacidad de irritación *in vitro* (*In Vitro Irritancy Score*, IVIS)**: Fórmula empírica utilizada en el método de ensayo BCOP mediante la cual se combinan en una sola puntuación *in vitro* por cada grupo de tratamiento los valores medios de opacidad y de permeabilidad de cada grupo de tratamiento. IVIS = valor medio de opacidad + (15 × valor medio de permeabilidad).

**Efectos irreversibles en el ojo**: Véase la definición de «Lesiones oculares graves».

▼M7

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta por dos o más sustancias que no reaccionan (4).

**Testigo negativo**: Muestra replicada no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo para determinar si el disolvente interactúa con el sistema de ensayo.

**Sin clasificar**: Producto que no está clasificado por irritación ocular (categoría 2, 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas) ni por lesión ocular grave (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas). Intercambiable con «sin categoría del SGA de las Naciones Unidas».

**Opacímetro**: Instrumento utilizado para medir la opacidad de la córnea evaluando cuantitativamente la transmisión de la luz a través de esta. El instrumento clásico tiene dos compartimentos, cada uno provisto de su propia fuente de luz y una célula fotoeléctrica. Un compartimento se utiliza para la córnea tratada, y el otro para calibrar y poner a cero el instrumento. Se envía a una célula fotoeléctrica la luz de una lámpara halógena a través de un compartimento de control (cámara vacía sin ventanas ni líquido) y se compara con la luz enviada a una célula fotoeléctrica a través del compartimento experimental, que alberga la cámara que contiene la córnea. Se compara la diferencia en la transmisión luminosa a partir de las células fotoeléctricas y se presenta un valor numérico de opacidad en un indicador digital.

**Testigo positivo**: Muestra replicada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con un producto del que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Efectos reversibles en el ojo**: Véase «Irritación ocular».

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios.

**Lesiones oculares graves**: Producción de una lesión tisular en el ojo o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con «efectos irreversibles en el ojo» y con «categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas» (4).

**Testigo del disolvente/vehículo**: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, incluido el disolvente o vehículo, y que se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo a fin de determinar la respuesta de base correspondiente a las muestras tratadas con el producto problema disuelto en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un testigo negativo en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Sustancia**: Elementos químicos y sus compuestos en estado natural u obtenidos mediante cualquier proceso de producción, incluidos los aditivos necesarios para mantener la estabilidad del producto y las eventuales impurezas derivadas del proceso empleado, pero excluidos los disolventes que se puedan separar sin influir en la estabilidad de la sustancia ni cambiar su composición (4).

▼M7

**Tensioactivo**: También denominado agente tensioactivo, es una sustancia, como un detergente, que puede reducir la tensión superficial de un líquido y, de este modo, permitir que forme espuma o penetre en los sólidos; se conoce también como agente humectante.

**Mezcla que contiene tensioactivos**: En el contexto del presente método de ensayo, es una mezcla que contiene uno o más agentes tensioactivos a una concentración final > 5 %.

**Enfoque descendente**: Enfoque gradual utilizado para un producto del que se sospecha que causa lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que inducen lesiones oculares graves (resultado positivo) frente a otros productos (resultado negativo).

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Estrategia de ensayos escalonados**: Estrategia de ensayo por fases, en la que se revisa toda la información existente sobre un producto problema, siguiendo un orden especificado, en un proceso de ponderación de las pruebas en cada escalón, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar al escalón siguiente. Si puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, no hace falta efectuar más ensayos. Si no puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, se aplica un procedimiento secuencial de ensayos con animales por fases hasta que pueda efectuarse una clasificación inequívoca.

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de la ONU)**: Sistema que propone la clasificación de productos químicos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (4).

**Categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas**: Véase la definición de «Lesiones oculares graves».

**Categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas**: Véase «Irritación ocular».

**Sin categoría del SGA de las Naciones Unidas**: Productos que no cumplen los requisitos para clasificarse en la categoría 1 o 2 (2A o 2B) del SGA de las Naciones Unidas. Intercambiable con «sin clasificar».

**Método de ensayo validado**: Método de ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado puede tener un comportamiento insuficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto.

**Ponderación de las pruebas**: Proceso de consideración de los aspectos favorables y desfavorables de los distintos elementos de información a efectos de alcanzar y confirmar una conclusión en cuanto al peligro potencial de un producto problema.

▼M7

*Apéndice 2*

## CAPACIDAD DE PREDICCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO BCOP

*Cuadro 1*

**Capacidad de predicción del método BCOP para identificar los productos que inducen lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de la ONU o del CLP de la UE frente a no categoría 1 (categoría 2 + sin categoría); categoría I de la EPA de EE.UU. frente a no de categoría I (categoría II + categoría III + categoría IV)]**

| Sistema de clasificación | Número | Exactitud | | Sensibilidad | | Falsos negativos | | Especificidad | | Falsos positivos | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | % | Número | % | Número | % | Número | % | Número | % | Número |
| SGA de las Naciones Unidas<br>CLP de la UE | 191 | 78,53 | 150/191 | 86,15 | 56/65 | 13,85 | 9/65 | 74,60 | 94/126 | 25,40 | 32/126 |
| EPA de EE.UU. | 190 | 78,95 | 150/190 | 85,71 | 54/63 | 14,29 | 9/63 | 75,59 | 96/127 | 24,41 | 31/127 |

*Cuadro 2:*

**Capacidad de predicción del BCOP para identificar los productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni por lesiones oculares graves («no irritantes») (sin categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas o del CLP de la UE frente a no sin categoría (categoría 1 + categoría 2); categoría IV de la EPA de EE.UU. frente a no de categoría IV (categoría I + categoría II + categoría III)]**

| Sistema de clasificación | Número | Exactitud | | Sensibilidad | | Falsos negativos | | Especificidad | | Falsos positivos | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | % | Número | % | Número | % | Número | % | Número | % | Número |
| SGA de las Naciones Unidas<br>CLP de la UE | 196 | 68,88 | 135/196 | 100 | 107/107 | 0 | 0/107 | 31,46 | 28/89 | 68,54 | 61/89 |
| EPA de EE.UU. | 190 | 82,11 | 156/190 | 93,15 | 136/146 | 6,85 | 10/146 | 45,45 | 20/44 | 54,55 | 24/44 |

▼M7

*Apéndice 3*

**PRODUCTOS UTILIZADOS PARA DEMOSTRAR LA APTITUD DEL MÉTODO DE ENSAYO BCOP**

Antes de proceder al uso sistemático de este método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su aptitud técnica, identificando correctamente la clasificación de los trece productos recomendados del cuadro 1 en cuanto al peligro para los ojos. Estos productos se seleccionaron para representar la gama de respuestas en cuanto a los peligros para los ojos sobre la base de los resultados del ensayo *in vivo* con ojo de conejo (TG 405) (17) y el sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas (es decir, categorías 1, 2A, 2B, o sin clasificar) (4). Otros criterios de selección fueron el que los productos estuvieran disponibles en el mercado, que tuvieran datos de referencia *in vivo* de alta calidad y también datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el método de ensayo BCOP. Se encuentran datos de referencia en el documento de resumen simplificado (3) y en el documento de revisión de fondo del ICCVAM sobre el método de ensayo BCOP (2)(18).

*Cuadro 1:*

**Productos recomendados para demostrar la aptitud técnica con el método de ensayo BCOP**

| Producto | CAS RN | Clase química ([1]) | Estado físico | Clasificación *in vivo* ([2]) | Clasificación BCOP |
|---|---|---|---|---|---|
| Cloruro de benzalconio (5 %) | 8001-54-5 | Compuesto onio | Líquido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Clorhexidina | 55-56-1 | Amina, amidina | Sólido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Ácido dibenzoil-L-tartárico | 2743-38-6 | Ácido carboxílico, éster | Sólido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Imidazol | 288-32-4 | Heterociclo | Sólido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Ácido tricloroacético (30 %) | 76-03-9 | Ácido carboxílico | Líquido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Cloruro de 2,6-dicloro-benzoilo | 4659-45-4 | Haluro de acilo | Líquido | Categoría 2 A | No se puede hacer ninguna predicción exacta/fiable |
| 2-Metilacetoacetato de etilo | 609-14-3 | Cetona, éster | Líquido | Categoría 2 B | No se puede hacer ninguna predicción exacta/fiable |
| Nitrato de amonio | 6484-52-2 | Sal inorgánica | Sólido | Categoría 2 ([3]) | No se puede hacer ninguna predicción exacta/fiable |
| EDTA, sal de dipotasio | 25102-12-9 | Amina, ácido carboxílico (sal) | Sólido | Sin clasificar | Sin clasificar |
| Tween 20 | 9005-64-5 | Éster, poliéter | Líquido | Sin clasificar | Sin clasificar |
| 2-Mercaptopirimidina | 1450-85-7 | Haluro de acilo | Sólido | Sin clasificar | Sin clasificar |
| Fenilbutazona | 50-33-9 | Heterociclo | Sólido | Sin clasificar | Sin clasificar |

▼**M7**

| Producto | CAS RN | Clase química ([1]) | Estado físico | Clasificación *in vivo* ([2]) | Clasificación BCOP |
|---|---|---|---|---|---|
| Éter laurílico de polioxietileno 23 (BRIJ- 35) (10 %) | 9002-92-0 | Alcohol | Líquido | Sin clasificar | Sin clasificar |

Abreviaturas: CAS RN: número de registro del Chemical Abstracts Service.

([1]) Se han asignado clases químicas a cada producto problema utilizando un sistema de clasificación habitual, basado en el sistema de clasificación de materias médicas de la National Library of Medicine (MeSH) (se puede encontrar en la dirección http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (TG 405 de la OCDE) (17) y utilizando el SGA de las Naciones Unidas (4).

([3]) La clasificación como 2A o 2B depende de la interpretación del criterio del SGA de las Naciones Unidas para distinguir entre estas dos categorías, es decir, 1 de 3 frente a 2 de 3 animales que presentan el día 7 efectos necesarios para generar una clasificación de la categoría 2A. El estudio *in vivo* incluye 3 animales. Todos los parámetros aparte del enrojecimiento de la conjuntiva en un solo animal se recuperan hasta una puntuación de cero para el día 7 o antes. El único animal que no está recuperado completamente para el día 7 tiene una puntuación de 1 en cuanto al enrojecimiento de la conjuntiva (el día 7) que se recupera plenamente el día 10.

▼M7

*Apéndice 4*

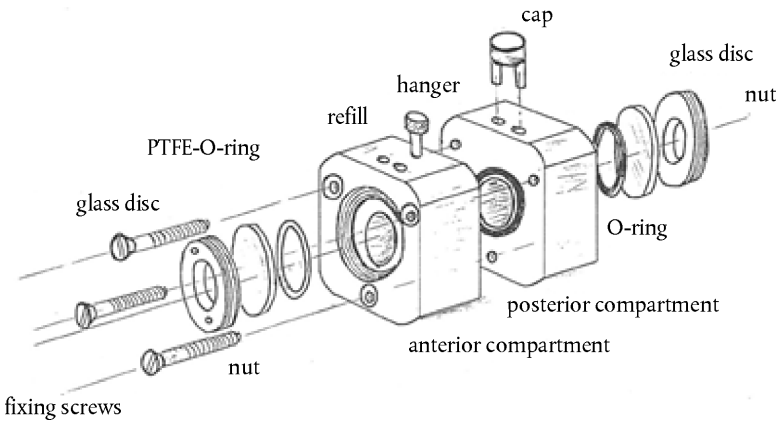
## SOPORTE DE CÓRNEA PARA EL MÉTODO BCOP

Los soportes de córnea para el método BCOP se hacen de material inerte, como polipropileno. Los soportes están formados por dos mitades (una cámara anterior y una cámara posterior), y tienen dos cámaras internas cilíndricas similares. Cada cámara está diseñada para albergar un volumen de unos 5 ml y termina en una ventana de cristal, a través de la cual se hacen las mediciones de la opacidad. Cada cámara interna tiene unas dimensiones de 1,7 cm de diámetro y 2,2 cm de profundidad ([1]). Para evitar fugas se utiliza una junta tórica situada en la cámara posterior. Las córneas se colocan, con el lado endotelial hacia abajo, sobre la junta tórica de las cámaras posteriores, y las cámaras anteriores se colocan sobre el lado epitelial de las córneas. Las cámaras se mantienen en su posición mediante tres tornillos de acero inoxidable situados en los bordes externos de la cámara. El extremo de cada cámara tiene una ventana de cristal, que puede retirarse para facilitar el acceso a la córnea. Para evitar fugas, se pone también una junta tórica entre la ventana de cristal y la cámara. En la parte superior de cada cámara hay dos agujeros que permiten introducir y retirar el medio y los productos problema. Se cierran con tapones de goma durante los periodos de tratamiento y de incubación. La transmisión de la luz a través de los soportes de córnea puede cambiar, ya que los efectos del desgaste o de la acumulación de residuos químicos específicos sobre las perforaciones de la cámara interior o en las ventanas de vidrio pueden afectar a la dispersión o a la reflectancia de la luz. La consecuencia puede ser que aumente o disminuya la transmisión de la luz de base (y a la inversa las lecturas de la opacidad de base) a través de los soportes de las córneas, y puede manifestarse como cambios notables en las mediciones previstas de la opacidad inicial de base de la córnea en distintas cámaras (es decir, los valores iniciales de opacidad de la córnea en distintos soportes de córnea específicos pueden diferir normalmente en más de 2 o 3 unidades de opacidad respecto a los valores de base). Cada laboratorio debe considerar el establecimiento de un programa de evaluación de los cambios en la transmisión de la luz a través de los soportes de córnea, dependiendo de la naturaleza de los productos problema y de la frecuencia de uso de las cámaras. Para fijar los valores de base, los soportes de córnea pueden comprobarse antes de su uso rutinario procediendo a la medición de los valores de opacidad de base (o de transmisión luminosa) de cámaras llenas con medio completo, sin córneas. Los soportes de córnea se comprueban periódicamente después en cuanto a los cambios en la transmisión de la luz en los períodos de utilización. Cada laboratorio puede determinar la frecuencia con la que se deberán comprobar los soportes de córnea, en función de los productos problema, la frecuencia de uso, y las observaciones de cambios en los valores de base de opacidad de la córnea. Si se observan cambios notables en la transmisión de la luz a través de los soportes de córnea, ha de considerarse la posibilidad de proceder al pulido o limpieza adecuados de la superficie interior de los soportes de córnea o a su sustitución.

([1]) Estas dimensiones corresponden al soporte de córnea utilizado para vacas de entre 12 y 60 meses de edad. En caso de que se utilicen animales de entre 6 y 12 meses de edad, puede ser necesario diseñar el soporte de manera que cada cámara albergue un volumen de 4 ml, y cada una de las cámaras internas mida 1,5 cm de diámetro y 2,2 cm de profundidad. Es importante que en todos los soportes de córnea de nuevo diseño la proporción entre la superficie de córnea expuesta y el volumen de la cámara posterior sea la misma que en el soporte de córnea tradicional. Se trata de una condición necesaria para asegurar que los valores de permeabilidad se determinan correctamente a efectos del cálculo de la puntuación IVIS con la fórmula propuesta.

▼M7

**Soporte de córnea: Diagrama despiezado**



▼M7

*Apéndice 5*

**OPACÍMETRO**

El opacímetro es un dispositivo que mide la transmisión luminosa. Por ejemplo, en el dispositivo OP-KIT de Electro Design (Riom, Francia) utilizado en la validación del método de ensayo BCOP, se envía a una célula fotoeléctrica la luz de una lámpara halógena a través de un compartimento testigo (cámara vacía sin ventanas ni líquido) y se compara con la luz enviada a una célula fotoeléctrica a través del compartimento experimental, que alberga la cámara que contiene la córnea. Se compara la diferencia en la transmisión luminosa a partir de las células fotoeléctricas y se presenta un valor numérico de opacidad en un indicador digital. Se determina el número de unidades de opacidad. Es posible utilizar otros tipos de opacímetros con una configuración diferente (por ejemplo, que no requieran mediciones paralelas de los compartimentos testigo y experimental) cuando se haya demostrado que dan resultados similares a los del dispositivo validado.

Las respuestas del opacímetro deben ser lineales a lo largo de una gama de lecturas de opacidad que incluya los valores de corte utilizados para las diferentes clasificaciones descritas por el modelo de predicción (es decir, hasta el valor de corte que determina la corrosividad / capacidad de irritación intensa). Para garantizar que las lecturas son lineales y exactas hasta la zona de 75-80 unidades de opacidad, es necesario calibrar el opacímetro utilizando una serie de calibradores. Los calibradores se introducen en la cámara de calibración (cámara para córneas diseñada para contener los calibradores) y se toman las lecturas en el opacímetro. La cámara de calibración está designada para mantener los calibradores a la misma distancia aproximadamente entre la luz y la célula fotoeléctrica a la que se colocarían las córneas durante las mediciones de la opacidad. Los valores de referencia y el punto de ajuste inicial dependen del tipo de dispositivo utilizado. La linealidad de las mediciones de la opacidad debe garantizarse mediante procedimientos adecuados (específicos de cada instrumento). Por ejemplo, para los dispositivos OP-KIT de Electro Design (Riom, Francia), el opacímetro se calibra en primer lugar a 0 unidades de opacidad utilizando la cámara de calibración sin ningún calibrador. A continuación se ponen en esta cámara tres calibradores diferentes, uno a uno, y se miden las opacidades correspondientes. A los calibradores 1, 2 y 3 deben corresponderles unas lecturas de opacidad iguales a sus valores establecidos de 75, 150, y 225 unidades de opacidad, respectivamente, ± 5 %.

▼M7

## B.48. MÉTODO DE ENSAYO DE OJO DE POLLO AISLADO PARA IDENTIFICAR: I) PRODUCTOS QUE PROVOCAN LESIONES OCULARES GRAVES Y II) PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN POR IRRITACIÓN OCULAR NI LESIONES OCULARES GRAVES

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 438 de la OCDE (2013). El método de ensayo de ojo de pollo aislado (conocido por la siglas de su nombre en inglés, ICE), fue evaluado por el Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos estadounidense (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM), junto con el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) y el Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM), en 2006 y 2010 (1) (2) (3). En la primera evaluación, se consideró que el ICE es un método de ensayo científicamente válido para su uso como ensayo de cribado para identificar productos (sustancias y mezclas) que provocan lesiones oculares graves (categoría 1), según se definen en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) (2) (4) y en el Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) ([1]). En la segunda evaluación, el método de ensayo ICE se evaluó en cuanto a su utilidad como ensayo de cribado para identificar productos que no están clasificados por irritación ocular ni por lesiones oculares graves según se definen en el SGA de las Naciones Unidas (3) (4). Los resultados del estudio de validación y las recomendaciones del grupo de revisión por pares mantuvieron la recomendación original de utilizar el ICE para la clasificación de los productos que inducen lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas), ya que la base de datos disponible se ha mantenido sin cambios desde la validación original por el ICCVAM. En esa fase, no se sugirieron nuevas recomendaciones de ampliación del ámbito de aplicación del ICE para incluir también otras categorías. Se llevó a cabo una reevaluación del conjunto de datos *in vitro* e *in vivo* utilizados en el estudio de validación, con el propósito de evaluar la utilidad del ICE para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (5). Esta reevaluación llegó a la conclusión de que el método de ensayo ICE puede utilizarse también para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves según se definen en el SGA de las Naciones Unidas (4) (5). El presente método de ensayo incluye los usos recomendados y las limitaciones del método de ensayo ICE sobre la base de estas evaluaciones. Las principales diferencias entre la versión inicial de 2009 y la versión actualizada de 2013 de las directrices de ensayo de la OCDE incluyen, entre otros elementos, el uso del método de ensayo ICE para identificar productos que no requieren clasificación según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas, una actualización de varios aspectos del informe de ensayo, una actualización del apéndice 1 sobre definiciones, y una actualización del apéndice 2 sobre los productos de la prueba de aptitud.

Actualmente se reconoce en general que, en un futuro próximo, ningún ensayo de irritación ocular *in vitro* podrá sustituir por sí solo al ensayo ocular de Draize *in vivo* para predecir toda la gama de irritación causada por las distintas categorías de productos. Sin embargo, unas combinaciones estratégicas de varios métodos de ensayo alternativos dentro de una estrategia de ensayos (escalonados) sí podrán sustituir al ensayo ocular de Draize (6). El enfoque descendente (7) está diseñado para utilizarse cuando, sobre la base de la información existente, se espera de un producto que tenga una alta capacidad de irritación, mientras que el enfoque ascendente (7) está diseñado para utilizarse cuando, sobre la base de la información existente, se espera de un producto que no cause irritación ocular suficiente para exigir una clasificación. El método de ensayo ICE es un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse, en determinadas circunstancias y con limitaciones específicas como se contempla en los puntos 8 a 10, con fines de

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

clasificación de peligros para los ojos y de etiquetado de productos. Si bien no se considera válido para sustituir por sí solo al ensayo *in vivo* con ojo de conejo, el método de ensayo ICE se recomienda como fase inicial en una estrategia de ensayo tal como el enfoque descendente sugerido por Scott *et al.* (7) para identificar los productos que provocan lesiones oculares graves, es decir, los productos que han de clasificarse en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas, sin necesidad de hacer más pruebas (4). El método de ensayo ICE se recomienda también para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves, según se definen en el SGA de las Naciones Unidas (sin categoría) (4), por lo que puede utilizarse como fase inicial dentro de una estrategia de ensayos de enfoque ascendente (7). No obstante, un producto del que no se espere que cause lesiones oculares graves o que no esté clasificado por irritación ocular o lesiones oculares graves según el método de ensayo ICE tendría que someterse a ensayos adicionales (*in vitro* o *in vivo*) para establecer una clasificación definitiva. Además, las autoridades reguladoras competentes deben ser consultadas antes de utilizar el ICE en un enfoque ascendente en relación con otros regímenes de clasificación distintos del SGA de las Naciones Unidas.

El objetivo del presente método de ensayo es describir los procedimientos utilizados para evaluar el posible peligro para los ojos de un producto problema en función de su capacidad de inducir o no toxicidad para un ojo enucleado de pollo. Los efectos tóxicos sobre la córnea se miden mediante: i) una evaluación cualitativa de la opacidad, ii) una evaluación cualitativa de las lesiones provocadas al epitelio sobre la base de la aplicación de fluoresceína en el ojo (retención de fluoresceína), iii) una medición cuantitativa del aumento del espesor (inflamación), y iv) una evaluación cualitativa de las lesiones morfológicas macroscópicas de la superficie. Las evaluaciones de la opacidad, la inflamación y las lesiones de la córnea tras la exposición de esta a un producto problema se efectúan por separado y después se combinan para llegar a una clasificación de la capacidad de irritación ocular.

En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

El presente método de ensayo se basa en el protocolo sugerido en el documento de orientación de la OCDE 160 (8), elaborado siguiendo el estudio internacional de validación del ICCVAM (1) (3) (9), con aportaciones del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos, del Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos, y del Departamento de Toxicología y Farmacología Aplicada de Calidad de la Vida de TNO de los Países Bajos (TNO Quality of Life Department of Toxicology and Applied Pharmacology). El protocolo se basa en la información obtenida a partir de protocolos publicados, así como del protocolo actualmente utilizado por TNO (10) (11) (12) (13) (14).

Se ha estudiado una amplia gama de productos en la validación subyacente al presente método de ensayo, y la base de datos empíricos del estudio de validación contaba con 152 productos, de los que 72 eran sustancias y 80, mezclas (5). El método de ensayo es aplicable a sólidos, líquidos, emulsiones y geles. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Aún no se ha efectuado ningún estudio de validación con gases y aerosoles.

El método de ensayo ICE puede utilizarse para identificar los productos que provocan lesiones oculares graves, es decir, que deben clasificarse como productos de la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas (4). Cuando se utiliza para este fin, las limitaciones que se han detectado en el método de ensayo ICE están relacionadas con las elevadas tasas de falsos resultados positivos de alcoholes y con las elevadas tasas de falsos resultados negativos de sólidos y tensioactivos (1) (3) (9). Sin embargo, las tasas de falsos negativos en este contexto (productos de categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas identificados como que no pertenecen a esta categoría) no son críticas, ya que todos los productos problema

▼M7

que dan resultado negativo se someten posteriormente a otro u otros ensayos *in vitro* validados adecuadamente, o como última opción con conejos, en función de las exigencias normativas, utilizando una estrategia de ensayo secuencial en un enfoque de ponderación de las pruebas. Cabe señalar que los sólidos pueden dar lugar a condiciones de exposición variables y extremas en el ensayo *in vivo* de irritación ocular de Draize, lo cual puede derivar en resultados poco pertinentes sobre el verdadero potencial de irritación (15). Los investigadores pueden considerar la utilización de este método de ensayo con todos los tipos de productos, aceptándose un resultado positivo como indicativo de lesiones oculares graves, es decir, de clasificación en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas sin ensayos adicionales. Sin embargo, los resultados positivos obtenidos con alcoholes deben interpretarse con precaución, debido al riesgo de sobrepredicción.

Cuando se utiliza para identificar productos que inducen lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas), el método de ensayo ICE tiene una exactitud general del 86 % (120/140), una tasa de falsos positivos del 6 % (7/113), y una tasa de falsos negativos del 48 % (13/27), cuando se compara con los datos del método de ensayo *in vivo* con ojo de conejo, clasificados según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas (4) (5).

El método de ensayo ICE puede utilizarse también para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves con arreglo al sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas (4). Las autoridades reguladoras competentes deben ser consultadas antes de utilizar el ICE en un enfoque ascendente en relación con otros regímenes de clasificación. Este método de ensayo puede utilizarse con todos los tipos de productos, aceptándose un resultado negativo para no clasificar el producto por irritación ocular o lesiones oculares graves. Sin embargo, sobre la base de un solo resultado a partir de la base de datos de la validación, puede haber riesgo de infrapredicción de las pinturas antiincrustantes que contienen disolventes orgánicos (5).

Cuando se utiliza para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves, el método de ensayo ICE tiene una exactitud general del 82 % (125/152), una tasa de falsos positivos del 33 % (26/79), y una tasa de falsos negativos del 1 % (1/73), cuando se compara con los datos del método de ensayo *in vivo* con ojo de conejo, clasificados según el SGA de las Naciones Unidas (4) (5). Cuando los productos problema de ciertas clases (en concreto, pinturas antiincrustantes que contienen disolventes orgánicos) se excluyen de la base de datos, el método de ensayo ICE tiene una exactitud del 83 % (123/149), una tasa de falsos positivos del 33 % (26/78), y una tasa de falsos negativos del 0 % (0/71) para el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas (4) (5).

El método de ensayo ICE no se recomienda para la identificación de productos problema que deben clasificarse como irritantes oculares (es decir, de categoría 2 o categoría 2A del SGA de las Naciones Unidas) o de productos problema que deben clasificarse como moderadamente irritantes para los ojos (categoría 2B del SGA de las Naciones Unidas), dado el considerable número de productos de la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas clasificados de forma insuficiente en las categorías 2, 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas y de productos sin categoría del SGA de las Naciones Unidas clasificados de forma excesiva en las categorías 2, 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas. A tal fin, pueden resultar necesarias pruebas adicionales con otro método adecuado.

Todos los procedimientos con ojos de pollo deben ajustarse a las normas y procedimientos aplicables de la instalación de ensayo en relación con la manipulación de materiales derivados del hombre o de animales, entre los que figuran los tejidos o los líquidos tisulares. Se recomienda observar las precauciones universales de laboratorio (16).

Si bien el método de ensayo ICE no tiene en cuenta las lesiones de la conjuntiva y del iris que se evalúan en el método de ensayo de irritación ocular del conejo, sí atiende a los efectos en la córnea, que son un factor de primer orden de la clasificación *in vivo* cuando se considera la clasificación del SGA de las Naciones Unidas. Asimismo, aunque la reversibilidad de las lesiones de la córnea no

▼M7

puede evaluarse *per se* con el método de ensayo ICE, se ha propuesto, sobre la base de los estudios en ojo de conejo, que la evaluación de la profundidad inicial de la lesión de la córnea puede utilizarse para identificar ciertos tipos de efectos irreversibles (17). En particular, se necesitan más conocimientos científicos para comprender cómo se dan efectos irreversibles no relacionados con lesiones iniciales de alto nivel. Finalmente, el método de ensayo ICE no permite la evaluación del potencial de toxicidad sistémica asociado con la exposición ocular.

El presente método de ensayo se actualizará periódicamente a la luz de la nueva información y los datos que se vayan considerando. Por ejemplo, la histopatología puede ser útil si se necesita una caracterización más completa de las lesiones de la córnea. Para evaluar esta posibilidad, se insta a los usuarios a conservar los ojos y a preparar muestras de histopatología que puedan utilizarse para compilar una base de datos y criterios de decisión con los que se pueda seguir mejorando la exactitud de este método. La OCDE ha elaborado un documento de orientación sobre el uso de métodos de ensayo de la toxicidad ocular *in vitro*, que incluye procedimientos detallados sobre la recogida de muestras de histopatología, así como información sobre dónde presentar las muestras o los datos de histopatología (8).

Cuando algún laboratorio establezca inicialmente este ensayo, deben utilizarse los productos para demostrar la aptitud que se indican en el apéndice 2. Los laboratorios pueden utilizar estos productos para demostrar su competencia técnica en la aplicación del método de ensayo ICE antes de presentar, con fines de clasificación normativa de peligros, los datos obtenidos con este ensayo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método de ensayo ICE es un modelo organotípico con mantenimiento a corto plazo del ojo de pollo *in vitro*. En este método de ensayo, las lesiones provocadas por el producto problema se evalúan determinando la inflamación, la opacidad y la retención de fluoresceína en la córnea. Mientras que los dos últimos parámetros implican una evaluación cualitativa, el análisis de la inflamación de la córnea permite una evaluación cuantitativa. Cada medición se convierte en una puntuación cuantitativa utilizada para calcular un índice general de irritación, o bien se somete a una categorización cualitativa para asignarle una clasificación de peligro ocular *in vitro*, bien en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas o bien sin clasificar en el SGA de las Naciones Unidas. Cualquiera de estos resultados puede utilizarse a continuación para predecir el potencial de causar lesiones oculares graves *in vivo* o la ausencia de requisito de clasificación en cuanto al peligro para los ojos de un producto problema (véanse los criterios de decisión). No obstante, no se puede dar ninguna clasificación a los productos de los que no se predice que causan lesiones oculares graves o que no se clasifican con el método de ensayo ICE (véase el punto 11).

**Fuente y edad de los ojos de pollo**

Tradicionalmente se han venido utilizando para este ensayo los ojos tomados de pollos obtenidos de mataderos donde se sacrifican para el consumo humano, con lo que se suprime la necesidad de disponer de animales de laboratorio. Solo se utilizan los ojos de animales sanos considerados adecuados para entrar en la cadena alimentaria humana.

Aunque aún no se ha efectuado ningún estudio comparativo para evaluar la edad óptima de los pollos, la edad y el peso de los pollos usados tradicionalmente en este método de ensayo corresponden a los pollos tiernos que se suelen tratar en los mataderos de aves de corral (es decir, de unas siete semanas de edad y entre 1, 5 y 2,5 kg).

**Recogida y transporte de los ojos al laboratorio**

Las cabezas deben retirarse inmediatamente después de la sedación de los pollos, generalmente por choque eléctrico, y de la incisión del cuello para su sangrado. Las fuentes locales de pollos deben estar situadas cerca del laboratorio de forma que las cabezas puedan transferirse desde el matadero al laboratorio en poco tiempo, a fin de reducir al mínimo el deterioro y la contaminación bacteriana. Debe reducirse al mínimo el tiempo transcurrido entre la recogida de las cabezas de pollo y la colocación de los ojos en la cámara de superfusión tras su enucleación (lo normal es que este plazo no exceda de dos horas) a fin de garantizar que se cumplen los criterios de aceptación del ensayo. Todos los ojos utilizados en el ensayo deben proceder del mismo grupo de ojos recogidos un día concreto.

▼M7

Como los ojos se disecan en el laboratorio, las cabezas intactas se transportan desde el matadero a temperatura ambiente (normalmente entre 18 °C y 25 °C) en cajas de plástico humidificadas mediante telas mojadas con solución salina isotónica.

**Criterios de selección y número de los ojos utilizados en el ICE**

Se desechan los ojos que tienen una elevada tinción de fluoresceína de base (es decir, > 0,5) o una elevada puntuación de opacidad de la córnea (es decir, > 0,5) una vez han sido enucleados.

Cada grupo de tratamiento y de testigo positivo en paralelo consiste en al menos tres ojos. El grupo de testigo negativo o el testigo del disolvente (si se utiliza un disolvente distinto de la solución salina) consiste en al menos un ojo.

En el caso de materiales sólidos que dan un resultado de sin clasificar según el SGA, se recomienda realizar el ensayo con una segunda tanda de tres ojos para confirmar o descartar el resultado negativo.

PROCEDIMIENTO

**Preparación de los ojos**

Se cortan los párpados cuidadosamente, procurando no dañar la córnea. Se evalúa rápidamente la integridad de la córnea mediante la aplicación de una gota de fluoresceína sódica al 2 % (p/v) a la superficie de la córnea durante unos segundos, seguida de lavado con solución salina isotónica. Los ojos tratados con fluoresceína se examinan a continuación con un microscopio de lámpara de hendidura para asegurarse de que la córnea está ilesa (es decir, tiene puntuaciones de retención de fluoresceína y de opacidad de la córnea ≤ 0,5).

Los ojos que no presenten lesiones se extraen del cráneo, teniendo cuidado de no lesionar la córnea. El globo ocular se extrae de la órbita sujetando firmemente con pinzas quirúrgicas la membrana nictitante, y los músculos del ojo se cortan con unas tijeras curvas de punta roma. Es importante no causar lesiones a la córnea por una presión excesiva (es decir, artefactos de compresión).

Cuando se retira el ojo de la órbita, debe quedar con él una porción visible del nervio óptico. Una vez retirado de la órbita, el ojo se pone en una gasa hidrófila y se retiran, cortándolos, la membrana nictitante y demás tejidos conjuntivos.

El ojo enucleado se monta en un soporte de acero inoxidable, con la córnea situada verticalmente. El soporte se transfiere a continuación a la cámara de un aparato de superfusión (18), donde se posiciona de manera que toda la córnea reciba el goteo de solución salina isotónica (3-4 gotas por minuto o 0.1-0,15 ml/min). Las cámaras de los aparatos de superfusión deben estar termostatizadas a 32 ± 1,5 °C. El apéndice 3 incluye un diagrama de un aparato de superfusión normal y del soporte para los ojos, que pueden obtenerse comercialmente o bien construirse en el propio laboratorio. El aparato puede modificarse para cubrir las necesidades de un laboratorio concreto (por ejemplo, para albergar un número diferente de ojos).

Una vez colocados en el aparato de superfusión, los ojos se vuelven a examinar con un microscopio de lámpara de hendidura para asegurarse de que no han sufrido ninguna lesión durante el proceso de disección. También debe medirse en este momento el espesor de la córnea en el vértice corneal, utilizando el medidor de profundidad con el microscopio de lámpara de hendidura. Deben sustituirse los ojos que presenten: i) una puntuación de retención de fluoresceína > 0,5; ii) una opacidad corneal > 0,5; o iii) cualquier otro signo de lesión. En cuanto a los ojos que no se hayan rechazado por ninguno de estos criterios, deberán rechazarse también los ojos con un espesor de la córnea que se desvíe en más de un 10 % del valor medio de todos los ojos. Los usuarios deben ser conscientes de que con los microscopios de lámpara de hendidura pueden obtenerse diferentes mediciones del espesor de la córnea con diferentes ajustes de la anchura de la hendidura. Esta debe fijarse en 0,095 mm.

▼M7

Una vez examinados y aprobados todos los ojos, se incuban durante unos 45 o 60 minutos para estabilizarlos con el sistema de ensayo antes de administrar el producto. Tras el periodo de estabilización, se registra una medición de referencia inicial del espesor y de la opacidad de la córnea que sirva como referencia de base (es decir, a tiempo = 0). La puntuación de fluoresceína determinada en el momento de la disección se utiliza como medición de base respecto a este parámetro.

**Aplicación del producto problema**

Inmediatamente después de efectuar las mediciones de referencia iniciales, se retira el ojo (en su soporte) del aparato de superfusión, se pone en posición horizontal y se aplica a la córnea el producto problema.

Normalmente, los productos problema líquidos se estudian sin diluir, pero, en caso necesario, pueden someterse a dilución (por ejemplo, como parte del diseño del estudio). El disolvente preferido para disolver los productos problema es la solución salina fisiológica. Sin embargo, también pueden utilizarse otros disolventes en condiciones controladas, pero es necesario demostrar la idoneidad de los disolventes que sean distintos de la solución salina fisiológica.

Los productos problema líquidos se aplican a la córnea de forma que quede cubierta con el producto problema toda la superficie de la córnea de forma homogénea; el volumen normal es de 0,03 ml.

Cuando sea posible, los productos problema sólidos deben triturarse de la manera más fina posible con un mortero o con otro instrumento de trituración comparable. El polvo resultante se aplica a la córnea de forma que su superficie quede cubierta uniformemente con el producto problema; la cantidad normal es de 0,03 g.

El producto problema (líquido o sólido) se aplica durante 10 segundos y después se retira del ojo lavando con solución salina isotónica (aproximadamente 20 ml) a temperatura ambiente. El ojo (en su soporte) se vuelve a poner a continuación en el aparato de superfusión, en la posición vertical inicial. En caso necesario, podrá efectuarse un lavado adicional tras la aplicación de 10 segundos y en momentos posteriores (por ejemplo, tras el descubrimiento de residuos del producto problema en la córnea). En general, la cantidad de solución salina utilizada de forma adicional para el lavado no es determinante, pero sí es importante la observación de la adherencia del producto problema a la córnea.

**Productos testigo**

En cada experimento se deben incluir testigos en paralelo negativos (o del disolvente/vehículo) y positivos.

Cuando se estudian líquidos al 100 % o sólidos, se utiliza solución salina fisiológica como testigo negativo en paralelo en el método de ensayo ICE a fin de detectar cambios inespecíficos del sistema de ensayo y garantizar que las condiciones del ensayo no provocan inadecuadamente una respuesta de irritación.

Cuando se estudian líquidos diluidos, se incluye en el método de ensayo un grupo de testigo en paralelo del disolvente/vehículo a fin de detectar cambios inespecíficos del sistema de ensayo y garantizar que las condiciones del ensayo no provocan inadecuadamente una respuesta de irritación. Como se indica en el punto 31, solo pueden utilizarse los disolventes/vehículos de los que se haya demostrado que carecen de efectos adversos sobre el sistema de ensayo.

Se incluye como testigo positivo en paralelo en cada experimento un agente irritante ocular conocido, a fin de verificar que se provoca una respuesta adecuada. Como en el presente método se utiliza el ensayo ICE para identificar agentes corrosivos o irritantes intensos, el testigo positivo debe ser un producto de referencia que induzca una respuesta intensa con este método de ensayo. No obstante, para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la intensidad de la

▼M7

respuesta. Debe generarse una cantidad suficiente de datos *in vitro* del testigo positivo, de forma que se pueda calcular una banda aceptable, definida estadísticamente, para el testigo positivo. Si no se dispone de datos anteriores adecuados con el método de ensayo ICE respecto a un testigo positivo determinado, es posible que deban efectuarse estudios para conseguir esta información.

Pueden citarse como ejemplo de testigos positivos para productos problema líquidos el ácido acético al 10 % o el cloruro de benzalconio al 5 %, mientras que son ejemplos de testigos positivos para productos problema sólidos el hidróxido sódico o el imidazol.

Es útil disponer de productos de referencia para evaluar el potencial de irritación ocular de productos desconocidos dentro de una clase específica de productos, o para evaluar la capacidad de irritación relativa de un irritante ocular dentro de una gama específica de respuestas de irritación.

**Parámetros medidos**

Las córneas tratadas se evalúan antes de su tratamiento y a los 30, 75, 120, 180 y 240 minutos (± 5 minutos) después del lavado tras el tratamiento. Esta cadencia permite conseguir un número adecuado de mediciones a lo largo del periodo de tratamiento de cuatro horas, dejando tiempo suficiente entre mediciones para que puedan efectuarse las observaciones requeridas con todos los ojos.

Los parámetros evaluados son la opacidad, la inflamación, la retención de fluoresceína y los efectos morfológicos (por ejemplo, lesiones punteadas o aflojamiento del epitelio) de la córnea. A cada uno de los tiempos antes citados se determinan todos los parámetros, salvo la retención de fluoresceína (que se determina solo antes del tratamiento y a los 30 minutos tras la exposición al producto problema).

Se recomienda tomar fotografías para documentar la opacidad, la retención de fluoresceína, los efectos morfológicos y, en su caso, la histopatología de la córnea.

Tras el examen final a las cuatro horas, se insta a los usuarios a conservar los ojos en un fijador adecuado (por ejemplo, formol neutro amortiguado) para su eventual examen histopatológico; pueden verse más detalles en el punto 14 y la referencia (8).

La inflamación de la córnea se determina mediante mediciones del espesor de la córnea efectuadas con un paquímetro óptico en un microscopio de lámpara de hendidura. Se expresa en porcentaje y se calcula con la fórmula siguiente a partir de las mediciones del espesor de la córnea:

$$\left(\frac{\textit{espesor de la córnea al tiempo } t - \textit{espesor de la córnea al tiempo} = 0}{\textit{espesor de la córnea al tiempo} = 0}\right) \times 100$$

Se calcula el porcentaje medio de inflamación de la córnea de todos los ojos del ensayo a todos los tiempos de observación. A partir de la mayor puntuación media de inflamación de la córnea, observada a cualquiera de los tiempos seleccionados, se adjudica a cada producto problema una puntuación global de categoría (véase el punto 51).

La opacidad de la córnea se evalúa utilizando el área de esta que se encuentra opacificada más densamente para establecer la puntuación tal como se muestra en el cuadro 1. Se calcula el valor medio de opacidad de la córnea de todos los ojos del ensayo a todos los tiempos de observación. A partir de la mayor puntuación media de opacidad de la córnea, observada a cualquiera de los tiempos seleccionados, se adjudica a cada producto problema una puntuación global de categoría (véase el punto 51).

▼M7

*Cuadro 1.*

**Puntuaciones de opacidad de la córnea.**

| Puntuación | Observación |
|---|---|
| 0 | Sin opacidad |
| 0,5 | Opacidad muy débil |
| 1 | Zonas diseminadas o difusas; los detalles del iris se aprecian con claridad. |
| 2 | Zona translúcida fácilmente discernible; los detalles del iris están ligeramente oscurecidos. |
| 3 | Opacidad de la córnea intensa; no se ve ningún detalle preciso del iris; el tamaño de la pupila es apenas discernible. |
| 4 | Opacidad de la córnea completa; iris invisible |

La retención de fluoresceína se evalúa al tiempo de observación de 30 minutos únicamente, como se muestra en el cuadro 2. El valor medio de retención de fluoresceína de todos los ojos del ensayo se calcula entonces al tiempo de observación de 30 minutos, y se utiliza para obtener la puntuación global de categoría asignada a cada producto problema (véase el punto 51).

*Cuadro 2.*

**Puntuaciones de retención de fluoresceína.**

| Puntuación | Observación |
|---|---|
| 0 | Sin retención de fluoresceína |
| 0,5 | Tinción muy débil de células aisladas |
| 1 | Tinción de células aisladas dispersas por toda el área tratada de la córnea |
| 2 | Tinción densa de células aisladas focalizada o confluente |
| 3 | Fluoresceína retenida en grandes áreas confluentes de la córnea |

Entre los efectos morfológicos figuran el «punteamiento» de las células del epitelio corneal, el «aflojamiento» del epitelio, la «rugosidad» de la superficie corneal y el «pegado» del producto problema a la córnea. Estas observaciones pueden presentar una intensidad variable y darse simultáneamente. La clasificación de estas observaciones es subjetiva, según la interpretación del investigador.

DATOS E INFORME

**Evaluación de los datos**

Los resultados de la opacidad de la córnea, de la inflamación y de la retención de fluoresceína deben evaluarse por separado a fin de llegar a una clasificación ICE para cada parámetro. Las clases ICE de cada parámetro se combinan a continuación para generar una clasificación según la capacidad de irritación de cada producto problema.

**Criterios de decisión**

Una vez evaluado cada uno de los parámetros, pueden asignarse las clases ICE en función de unas bandas predeterminadas. La interpretación de la inflamación (cuadro 3), la opacidad (cuadro 4), y la retención de fluoresceína (cuadro 5) de la córnea utilizando cuatro clases ICE se efectúa según las siguientes escalas. Es importante señalar que las puntuaciones de inflamación de la córnea que figuran en el cuadro 3 se pueden aplicar solo si el espesor se mide con un microscopio

▼M7

de lámpara de hendidura (por ejemplo, Haag-Streit BP900) con dispositivo medidor de profundidad nº 1 y ajuste de la anchura de la hendidura a $9\frac{1}{2}$, lo que equivale a 0,095 mm. Los usuarios deben ser conscientes de que con los microscopios de lámpara de hendidura pueden obtenerse diferentes mediciones del espesor de la córnea si son diferentes los ajustes de la anchura de la hendidura.

*Cuadro 3.*

**Criterios de clasificación ICE según la inflamación de la córnea.**

| Inflamación media de la córnea (%) (*) | Clase ICE |
|---|---|
| 0 a 5 | I |
| > 5 a 12 | II |
| > 12 a 18 (> 75 min tras el tratamiento) | II |
| > 12 a 18 (≤ 75 min tras el tratamiento) | III |
| > 18 a 26 | III |
| > 26 a 32 (> 75 min tras el tratamiento) | III |
| > 26 a 32 (≤ 75 min tras el tratamiento) | IV |
| > 32 | IV |

(*) Puntuación media más elevada observada a cualquiera de los tiempos seleccionados.

*Cuadro 4.*

**Criterios de clasificación ICE según la opacidad.**

| Máxima puntuación media de la opacidad (*) | Clase ICE |
|---|---|
| 0,0-0,5 | I |
| 0,6-1,5 | II |
| 1,6-2,5 | III |
| 2,6-4,0 | IV |

(*) Puntuación media más elevada observada a cualquiera de los tiempos seleccionados (basándose en las puntuaciones de opacidad definidas en el cuadro 1).

*Cuadro 5.*

**Criterios de clasificación ICE según la retención media de fluoresceína.**

| Puntuación media de la retención de fluoresceína a los 30 minutos tras el tratamiento (*) | Clase ICE |
|---|---|
| 0,0-0,5 | I |
| 0,6-1,5 | II |
| 1,6-2,5 | III |
| 2,6-3,0 | IV |

(*) Sobre la base de las puntuaciones definidas en el cuadro 2.

La clasificación *in vitro* de un producto problema se evalúa leyendo la clasificación del SGA correspondiente a la combinación de categorías obtenidas con la inflamación de la córnea, la opacidad de la córnea y la retención de fluoresceína, tal como se describe en el cuadro 6.

▼M7

*Cuadro 6.*

**Clasificaciones *in vitro* globales.**

| Clasificación del SGA de las Naciones Unidas | Combinaciones de los tres parámetros |
|---|---|
| Sin categoría | 3 × I<br>2 × I, 1 × II |
| No puede hacerse ninguna predicción | Otras combinaciones |
| Categoría 1 | 3 × IV<br>2 × IV, 1 × III<br>2 × IV, 1 × II (*)<br>2 × IV, 1 × I (*)<br>Opacidad de la córnea ≥ 3 a los 30 min (en al menos dos ojos)<br>Opacidad de la córnea = 4 a cualquier tiempo (en al menos dos ojos)<br>Aflojamiento intenso del epitelio (en al menos un ojo) |

(*) Combinaciones menos probables.

**Criterios de aceptación del estudio**

Se considera que un ensayo es aceptable si los testigos negativos o del vehículo/disolvente en paralelo y los testigos positivos en paralelo se identifican como sin clasificar en el SGA y en la categoría 1 del SGA, respectivamente.

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la siguiente información, en caso de que corresponda a la realización del estudio:

*Productos problema y testigo*

— Denominación o denominaciones químicas, como la denominación estructural utilizada por el Chemical Abstracts Service (CAS), seguida por otras denominaciones, si se conocen;

— número de registro CAS, si se conoce;

— pureza y la composición de los productos problema/testigo (en porcentajes en peso), en la medida en que se disponga de esta información;

— propiedades físico-químicas pertinentes para la realización del estudio, como estado físico, volatilidad, pH, estabilidad, clase química o hidrosolubilidad;

— tratamiento de los productos problema y testigo antes del ensayo, en su caso (por ejemplo, calentamiento, trituración);

— estabilidad, si se conoce.

*Información referente al promotor y al laboratorio*

— Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;

— identificación de la fuente de los ojos (es decir, instalación en la que se han recogido).

*Condiciones del método de ensayo*

— Descripción del sistema de ensayo utilizado;

▼M7

— microscopio de lámpara de hendidura utilizado (por ejemplo, modelo) y ajustes instrumentales de este;

— referencia a resultados históricos de testigos positivos y negativos y, si procede, a datos históricos que demuestren bandas aceptables de testigos de referencia en paralelo;

— procedimiento utilizado para garantizar la integridad (es decir, la exactitud y la fiabilidad) del método de ensayo a lo largo del tiempo (por ejemplo, ensayo periódico de productos de la prueba de aptitud).

*Recogida y preparación de los ojos*

— Edad y peso del animal donante y, si están disponibles, otras características específicas de los animales de los que se han extraído los ojos (por ejemplo, sexo, cepa);

— condiciones de almacenamiento y transporte de los ojos (por ejemplo, fecha y hora de recogida de los ojos, plazo transcurrido entre la recogida de las cabezas de pollo y la colocación de los ojos enucleados en la cámara de superfusión);

— preparación y montaje de los ojos, con inclusión de declaraciones sobre su calidad, temperatura de las cámaras de los ojos, y criterios de selección de los ojos utilizados para los ensayos.

*Procedimiento*

— Número de réplicas utilizadas;

— identidad de los testigos positivos y negativos utilizados (en su caso, también los testigos de disolvente y de referencia);

— dosis del producto problema, aplicación y tiempo de exposición utilizados;

— tiempos de observación (antes y después del tratamiento);

— Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;

— Descripción de los criterios de aceptación del estudio seguidos;

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo.

*Resultados*

— Tabulación de las puntuaciones de inflamación, opacidad y retención de fluoresceína de la córnea, obtenidas en cada ojo y a cada tiempo de observación, incluidas las puntuaciones medias a cada tiempo de observación de todos los ojos estudiados;

— media más elevada de las puntuaciones observadas de inflamación, opacidad y retención de fluoresceína de la córnea (a cualquier tiempo), y su correspondiente clasificación ICE;

— descripción de otros eventuales efectos observados;

— la clasificación del SGA *in vitro* derivada;

— en su caso, fotografías del ojo.

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

▼**M7**

BIBLIOGRAFÍA


(1) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report — *In Vitro Ocular Toxicity* Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm.

(2) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants. Disponible en: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(3) ICCVAM (2010). ICCVAM Test Method Evaluation Report — Current Status of *in vitro* Test Methods for Identifying Mild/Moderate Ocular Irritants: The Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 10-7553A. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm.

(4) Naciones Unidas (2011). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA), cuarta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2011. Disponible en: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev4sp.pdf.

(5) Streamlined Summary Document Supporting OECD Test Guideline 438 on the Isolated Chicken Eye for Eye Irritation/Corrosion. Series on Testing and Assessment no. 188 (Part 1 and Part 2), OECD, Paris.

(6) Capítulo B.5 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.

(7) Scott L, Eskes C, Hoffman S, Adriaens E, Alepee N, Bufo M, Clothier R, Facchini D, Faller C, Guest R, Hamernik K, Harbell J, Hartung T, Kamp H, Le Varlet B, Meloni M, Mcnamee P, Osborn R, Pape W, Pfannenbecker U, Prinsen M, Seaman C, Spielmann H, Stokes W, Trouba K, Vassallo M, Van den Berghe C, Van Goethem F, Vinardell P, Zuang V (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-up and Top-down Approaches. Toxicology *In Vitro* 24, 1-9.

(8) OCDE (2011). Guidance Document on «The Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) and Isolated Chicken Eye (ICE) Test Methods»: Collection of Tissues for Histological Evaluation and Collection of Data on Non-Severe Irritants. Series on Testing and Assessment no. 160, OECD, Paris.

(9) ICCVAM (2006). Background review document: Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm.

(10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) DB-ALM (INVITTOX) (2009). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET) / Isolated Chicken Eye Test, 13pp. Disponible en: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/.

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol*. 34:291-296.

▼**M7**

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

(15) Prinsen, M.K. (2006). The Draize Eye Test and *in vitro* alternatives; a left-handed marriage? Toxicology *in Vitro* 20,78-81.

(16) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Disponible en: http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf.

(17) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

(18) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471-480.

▼**M7**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su «pertinencia». Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo.

**Producto de referencia**: Producto utilizado como patrón para comparar con un producto problema. Los productos de referencia deben presentar las siguientes propiedades: i) un origen coherente y fiable; ii) similitud estructural y funcional con la clase de productos problema; iii) características físicas y químicas conocidas; iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos; y v) potencia conocida en la banda de la respuesta deseada.

**Planteamiento ascendente**: Enfoque gradual utilizado para un producto del que se sospecha que no requiere clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que no requieren clasificación (resultado negativo) frente a otros productos (resultado positivo).

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Córnea**: Parte transparente delantera del globo ocular que cubre el iris y la pupila y permite el paso de la luz al interior.

**Opacidad de la córnea**: Medida del grado de opacidad de la córnea tras su exposición a un producto problema. Un aumento de la opacidad de la córnea indica que esta ha sufrido una lesión.

**Inflamación de la córnea**: Medición objetiva en el ensayo ICE de la magnitud de la dilatación de la córnea tras su exposición a un producto problema. Se expresa en porcentaje y se calcula a partir de las mediciones del espesor de la córnea de base (antes de la administración del producto) y de los espesores registrados a intervalos regulares tras la exposición al producto problema en el ensayo ICE. El grado de inflamación de la córnea indica las lesiones que esta ha sufrido.

**Irritación ocular**: Producción de cambios en el ojo, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que son totalmente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con «efectos reversibles en el ojo» y con «categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas» (4).

**Tasa de falsos negativos**: Proporción de todos los productos positivos identificados erróneamente como negativos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Tasa de falsos positivos**: Proporción de todos los productos negativos identificados erróneamente como positivos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Retención de fluoresceína**: Medición subjetiva en el ensayo ICE de la cantidad de fluoresceína sódica retenida por las células epiteliales de la córnea tras la exposición de esta a una sustancia problema. El grado de retención de fluoresceína indica las lesiones que ha sufrido el epitelio de la córnea.

**Peligro**: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**Efectos irreversibles en el ojo**: Véanse «lesiones oculares graves» y «categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas».

▼M7

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta por dos o más sustancias que no reaccionan (4).

**Testigo negativo**: Muestra replicada no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo para determinar si el disolvente interactúa con el sistema de ensayo.

**Sin clasificar**: Sustancia que no está clasificada por irritación ocular (categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas) ni por lesión ocular grave (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas). Intercambiable con «sin categoría del SGA de las Naciones Unidas».

**Testigo positivo**: Muestra replicada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con un producto del que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la intensidad de la respuesta.

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios.

**Efectos reversibles en el ojo**: Véanse «irritación ocular» y «categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas».

**Lesiones oculares graves**: Producción de una lesión tisular en el ojo o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con «efectos irreversibles en el ojo» y con «categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas» (4).

**Microscopio de lámpara de hendidura**: Instrumento utilizado para examinar directamente el ojo con el aumento de un microscopio binocular creando una imagen estereoscópica en vertical. En el método de ensayo ICE, este instrumento se utiliza para ver las estructuras anteriores del ojo del pollo, así como para medir objetivamente el espesor de la córnea con ayuda de un medidor de profundidad.

**Testigo del disolvente/vehículo**: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, incluido el disolvente o vehículo, y que se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo a fin de determinar la respuesta de base correspondiente a las muestras tratadas con el producto problema disuelto en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un testigo negativo en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Sustancia**: Elementos químicos y sus compuestos en estado natural u obtenidos mediante cualquier proceso de producción, incluidos los aditivos necesarios para mantener la estabilidad del producto y las impurezas derivadas del proceso empleado, pero excluidos los disolventes que se puedan separar sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni cambiar su composición (4).

**Tensioactivo**: También denominado agente tensioactivo, es una sustancia, como un detergente, que puede reducir la tensión superficial de un líquido y, de este modo, permitir que forme espuma o penetre en los sólidos; se conoce también como agente humectante.

▼M7

**Enfoque descendente**: Enfoque gradual utilizado para un producto del que se sospecha que causa lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que inducen lesiones oculares graves (resultado positivo) frente a otros productos (resultado negativo).

**Producto problema**: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

**Estrategia de ensayos escalonados**: Estrategia de ensayo por fases, en la que se revisa toda la información existente sobre un producto problema, siguiendo un orden especificado, en un proceso de ponderación de las pruebas en cada escalón, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar al escalón siguiente. Si puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, no hace falta efectuar más ensayos. Si no puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, se aplica un procedimiento secuencial de ensayos con animales por fases hasta que pueda efectuarse una clasificación inequívoca.

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de la ONU)**: Sistema que propone la clasificación de productos químicos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros fisicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (4).

**Categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas**: Véase «lesiones oculares graves» o «efectos irreversibles en el ojo».

**Categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas**: Véase «irritación ocular» o «efectos reversibles en el ojo».

**Sin categoría del SGA de las Naciones Unidas**: Sustancias que no cumplen los requisitos para clasificarse en la categoría 1 o 2 (2A o 2B) del SGA de las Naciones Unidas. Intercambiable con «sin clasificar».

**Método de ensayo validado**: Método de ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado puede tener un comportamiento insuficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto.

**Ponderación de las pruebas**: Proceso de consideración de los aspectos favorables y desfavorables de los distintos elementos de información a efectos de alcanzar y confirmar una conclusión en cuanto al peligro potencial de un producto.

▼M7

*Apéndice 2*

**PRODUCTOS UTILIZADOS PARA DEMOSTRAR LA APTITUD CON EL MÉTODO DE ENSAYO ICE**

Antes de proceder al uso sistemático de un método de ensayo que siga este modelo, los laboratorios deben demostrar su aptitud técnica, identificando correctamente la clasificación de los trece productos recomendados del cuadro 1 en cuanto al peligro para los ojos. Estos productos se seleccionaron para representar la gama de respuestas en cuanto a los peligros para los ojos sobre la base de los resultados del ensayo *in vivo* con ojo de conejo (TG 405) y el sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas (es decir, categorías 1, 2A, 2B, o sin clasificar según dicho sistema) (4). Otros criterios de selección fueron el que los productos estuvieran disponibles en el mercado, que tuvieran datos de referencia *in vivo* de alta calidad y también datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el método de ensayo ICE. Se encuentran datos de referencia en el documento SSD (5) y en el documento de revisión de fondo del ICCVAM sobre el método de ensayo ICE (9).

*Cuadro 1*

**Productos recomendados para demostrar la aptitud técnica con el método ICE**

| Producto | CAS RN | Clase química (1) | Estado físico | Clasificación *in vivo* (2) | Clasificación *in vitro* (3) |
|---|---|---|---|---|---|
| Cloruro de benzalconio (5 %) | 8001-54-5 | Compuesto onio | Líquido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Clorhexidina | 55-56-1 | Amina, amidina | Sólido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Ácido dibenzoil-L-tartárico | 2743-38-6 | Ácido carboxílico, éster | Sólido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Imidazol | 288-32-4 | Heterociclo | Sólido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Ácido tricloroacético (30 %) | 76-03-9 | Ácido carboxílico | Líquido | Categoría 1 | Categoría 1 |
| Cloruro de 2,6-dicloro-benzoílo | 4659-45-4 | Haluro de acilo | Líquido | Categoría 2 A | No se puede predecir (4). |
| Nitrato de amonio | 6484-52-2 | Sal inorgánica | Sólido | Categoría 2A (5) | No se puede predecir (4). |
| 2-Metil-acetoacetato de etilo | 609-14-3 | Cetona, éster | Líquido | Categoría 2 B | No se puede predecir (4). |
| Dimetilsulfóxido | 67-68-5 | Compuestos orgánicos de azufre | Líquido | Sin categoría | Sin categoría |
| Glicerol | 56-81-5 | Alcohol | Líquido | Sin categoría | Sin categoría (límite) |
| Metilciclopentano | 96-37-7 | Hidrocarburo (cíclico) | Líquido | Sin categoría | Sin categoría |
| n-Hexano | 110-54-3 | Hidrocarburo (acíclico) | Líquido | Sin categoría | Sin categoría |

▼**M7**

| Producto | CAS RN | Clase química ([1]) | Estado físico | Clasificación *in vivo* ([2]) | Clasificación *in vitro* ([3]) |
|---|---|---|---|---|---|
| Triacetina | 102-76-1 | Lípido | Líquido | Sin clasificar | Sin categoría |

Abreviaturas: CAS RN: número de registro del Chemical Abstracts Service.

([1]) Se han asignado clases químicas a cada producto problema utilizando un sistema de clasificación habitual, basado en el sistema de clasificación de materias médicas de la National Library of Medicine (MeSH) (se puede encontrar en la dirección http//www.nlm.nih.gov/mesh).

([2]) Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (TG 405 de la OCDE) y utilizando el SGA de las Naciones Unidas (4) (6).

([3]) Sobre la base de los resultados del ICE descritos en el cuadro 6.

([4]) Combinación de puntuaciones de ICE distinta de las descritas en el cuadro 6 para la identificación de productos sin categoría 1 del SGA y de la categoría 1 del SGA (véase el cuadro 6).

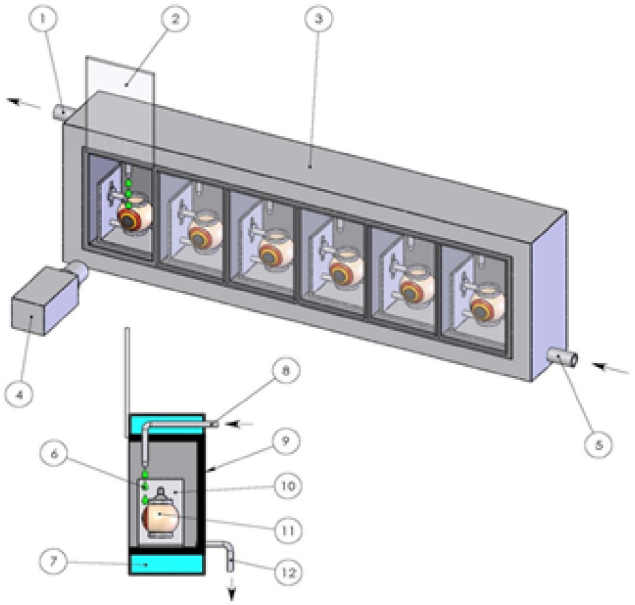
([5]) La clasificación como 2A o 2B depende de la interpretación del criterio del SGA de las Naciones Unidas para distinguir entre estas dos categorías, es decir, 1 de 3 frente a 2 de 3 animales que presentan el día 7 efectos necesarios para generar una clasificación en la categoría 2A. El estudio *in vivo* incluye 3 animales. Todos los parámetros aparte del enrojecimiento de la conjuntiva en un solo animal se recuperan hasta una puntuación de cero para el día 7 o antes. El único animal que no está recuperado completamente para el día 7 tiene una puntuación de 1 en cuanto al enrojecimiento de la conjuntiva (el día 7) que se recupera plenamente el día 10.

▼M7

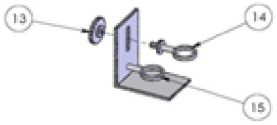
*Apéndice 3*

**DIAGRAMAS DEL APARATO DE SUPERFUSIÓN Y DEL SOPORTE PARA LOS OJOS**

*(Burton et al. (18) ofrecen descripciones genéricas adicionales del aparato de superfusión y del soporte para los ojos)*




CROSS SECTION COMPARTMENT




EYE HOLDER

| N.º de elemento | Descripción | N.º de elemento | Descripción |
|---|---|---|---|
| 1 | Salida de agua caliente | 9 | Compartimento |
| 2 | Puerta corredera | 10 | Soporte para el ojo |
| 3 | Aparato de superfusión | 11 | Ojo de pollo |
| 4 | Instrumento de medición óptica | 12 | Salida de solución salina |
| 5 | Entrada de agua caliente | 13 | Tornillo de tope |
| 6 | Solución salina | 14 | Brazo superior ajustable |
| 7 | Agua caliente | 15 | Brazo inferior fijo |
| 8 | Entrada de solución salina | | |

▼M7

## B.49. ENSAYO DE MICRONÚCLEOS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO*

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE 487 (2016). Forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. Se ha elaborado un documento de la OCDE que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a dichas directrices de ensayo (1).

El ensayo de micronúcleos *in vitro* (MNvit) es un ensayo de genotoxicidad para la detección de micronúcleos (MN) en el citoplasma de células en interfase. Los micronúcleos pueden proceder de fragmentos cromosómicos acéntricos (es decir, que carecen de centrómero) o de cromosomas completos que no pueden migrar a los polos durante la anafase de la división celular. Por tanto, el ensayo MNvit es un método *in vitro* que proporciona una base completa para investigar *in vitro* el potencial de causar lesiones cromosómicas porque permite detectar tanto aneúgenos como clastógenos (2) (3) en células que han sufrido división celular durante la exposición al producto problema o tras ella (véanse más detalles en el punto 13). Los micronúcleos representan una lesión que se ha transmitido a las células hijas, mientras que las aberraciones cromosómicas registradas en las células en metafase pueden no transmitirse. En ambos casos, los cambios pueden no ser compatibles con la supervivencia de las células.

El presente método de ensayo permite el uso de protocolos con y sin citocalasina B (citoB), que es un inhibidor de la polimerización de la actina. La adición de citoB antes de la mitosis provoca la formación de células binucleadas, con lo que permite la identificación y análisis de micronúcleos solo en las células que han completado una única mitosis (4) (5). Este método de ensayo contempla también el uso de protocolos sin bloqueo de la citocinesis, siempre que haya pruebas de que la población celular analizada ha experimentado la mitosis.

Además de utilizar el ensayo MNvit para identificar productos que inducen la formación de micronúcleos, el uso del etiquetado inmunoquímico de cinetocoros, o de la hibridación con sondas centroméricas o teloméricas [hibridación fluorescente *in situ* (FISH)], puede aportar también información adicional sobre los mecanismos del daño cromosómico y de la formación de micronúcleos (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17). Dichos procedimientos de etiquetado e hibridación pueden utilizarse cuando hay un aumento en la formación de micronúcleos y el investigador desea determinar si el aumento es consecuencia de fenómenos clastogénicos o aneugénicos.

Debido a que los micronúcleos de las células en interfase pueden evaluarse de forma relativamente objetiva, el personal de laboratorio solamente tiene que determinar el número de células binucleadas cuando se emplea citoB y la incidencia de las células micronucleadas en todos los casos. Como resultado, los portaobjetos pueden evaluarse de forma relativamente rápida y el análisis puede automatizarse. Esto hace que sea factible evaluar miles en lugar de cientos de células por tratamiento, lo que aumenta la potencia del ensayo. Finalmente, como los micronúcleos pueden derivarse de cromosomas retardados, existe la posibilidad de detectar agentes inductores de aneuploidía que son difíciles de estudiar en ensayos convencionales de aberraciones cromosómicas como, por ejemplo, el del capítulo B.10 del presente anexo (18). Sin embargo, el ensayo MNvit descrito en el presente método de ensayo no permite diferenciar los productos que inducen cambios en el número de cromosomas o en la ploidía de aquellos que inducen efectos clastogénicos sin recurrir a técnicas especiales como la FISH mencionada en el punto 4.

El ensayo MNvit es sólido y puede aplicarse a una diversidad de tipos celulares, y tanto en presencia como en ausencia de citoB. Hay muchos datos que apoyan la validez del ensayo MNvit recurriendo a diferentes tipos de células (cultivos de líneas celulares o cultivos primarios de células) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36). Aquí se incluyen, en particular, los estudios internacionales de validación coordinados por la Société

▼M7

Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (19) (20) (21) (22) (23) y los informes del International Workshop on Genotoxicity Testing (5) (17). Los datos disponibles también se han vuelto a evaluar en un estudio de validación retrospectiva con ponderación de los datos, por parte del Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA) de la Comisión Europea (CE), y el método de ensayo ha sido avalado en cuanto a su validez científica por el Comité Científico Consultivo del CEVMA (ESAC) (37) (38) (39).

El ensayo MNvit en células de mamífero puede emplear cultivos de líneas celulares o cultivos primarios de células humanas o de roedores. Como la frecuencia de fondo de la formación de micronúcleos influye en la sensibilidad del ensayo, se recomienda la utilización de tipos celulares con una frecuencia de fondo de micronúcleos que sea estable y definida. Las células utilizadas deben seleccionarse sobre la base de su capacidad de crecer bien en cultivo, la estabilidad de su cariotipo (incluido el número de cromosomas) y su frecuencia espontánea de micronúcleos (40). Por el momento, los datos de que se dispone no permiten formular recomendaciones firmes pero sugieren que es importante, a la hora de evaluar los peligros químicos, examinar la situación de la proteína p53, la estabilidad genética (cariotipo), la capacidad de reparación del ADN y el origen (roedores frente a hombre) de las células elegidas para el ensayo. Se recomienda, pues, a los usuarios de este método de ensayo que consideren la influencia de estas y otras características de las células sobre el comportamiento de una línea celular en cuanto a la detección de la inducción de la formación de micronúcleos, ya que la situación de los conocimientos en este ámbito está evolucionando.

En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

## CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

Los ensayos realizados *in vitro* suelen exigir la utilización de una fuente exógena de activación metabólica, salvo que las células sean competentes metabólicamente respecto a los productos problema. El sistema exógeno de activación metabólica no reproduce completamente las condiciones *in vivo*. Deben evitarse las condiciones que puedan conducir a resultados positivos falsos, que no reflejen la genotoxicidad de los productos problema; tales condiciones incluyen cambios en el pH (41) (42) (43) o en la osmolalidad, la interacción con el medio de cultivo (44) (45) o unos niveles excesivos de citotoxicidad (véase el punto 29).

Para analizar la inducción de la formación de micronúcleos, es fundamental que haya habido mitosis en los cultivos tanto tratados como sin tratar. La fase que proporciona más información para evaluar la formación de micronúcleos es la de las células que han completado una sola mitosis durante el tratamiento con el producto problema, o después de este tratamiento. En caso de nanomateriales fabricados, es necesario recurrir a adaptaciones específicas del presente método de ensayo, pero estas no se describen aquí.

Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines reglamentarios, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la reglamentación impone el ensayo de la mezcla.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

Los cultivos celulares de origen humano o de otros mamíferos se exponen al producto problema tanto con fuente exógena de activación metabólica como sin ella, salvo que se utilicen células con una capacidad adecuada de metabolización (véase el punto 19).

Durante la exposición al producto problema, o después de ella, las células se cultivan durante un tiempo suficiente para permitir que las lesiones cromosómicas u otros efectos sobre los ciclos o divisiones celulares provoquen la formación de micronúcleos en las células en interfase. Para la inducción de aneuploidía, es necesario normalmente que el producto problema esté presente durante la mitosis.

▼M7

Las células en interfase se recogen, se tiñen y se analizan para detectar la presencia de micronúcleos. Lo ideal es que los micronúcleos se evalúen solamente en las células que hayan completado la mitosis durante la exposición al producto problema o durante el período tras el tratamiento, en su caso. En los cultivos que se hayan tratado con un bloqueante de la citocinesis, esto se consigue fácilmente evaluando solo las células binucleadas. En ausencia de bloqueante de la citocinesis, es importante demostrar la probabilidad de que las células analizadas hayan experimentado la división celular, sobre la base de un aumento de la población celular, durante la exposición al producto problema o tras ella. En relación con todos los protocolos, es importante demostrar que ha habido proliferación celular en los cultivos tanto tratados como de testigo, y el grado de citotoxicidad o citostasis inducido por el producto problema debe estimarse en todos los cultivos que se examinan para evaluar la presencia de micronúcleos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Células**

Pueden utilizarse cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica de hombre o de otros mamíferos (7) (20) (46) (47) y una serie de líneas celulares de roedor, tales como las células CHO, V 79, CHL/IU y L5178Y, o líneas celulares humanas tales como TK6 (19) (20) (21) (22) (23) (26) (27) (28) (29) (31) (33) (34) (35) (36) (véase el punto 6). Se han utilizado para el ensayo de micronúcleos otras líneas celulares, tales como las HT29 (48), Caco-2 (49), HepaRG (50) (51), HepG2 (52) (53), A549 y células primarias de embrión de hámster sirio (54), pero por el momento no se han validado ampliamente. Por tanto, el uso de estos tipos y líneas celulares debe justificarse por la demostración de su comportamiento en el ensayo, como se describe en la sección de criterios de aceptabilidad. Se ha informado de que la citoB puede afectar al crecimiento de las células L5178Y, por lo que no se recomienda utilizarla con esta línea celular (23). Cuando se utilizan células primarias, por razones de bienestar animal debe considerarse la utilización de células de origen humano, cuando sea viable y se tomen de conformidad con los principios éticos humanos y la reglamentación.

Los linfocitos de sangre periférica humana deben obtenerse de individuos jóvenes (aproximadamente de 18 a 35 años de edad), no fumadores, sin enfermedades conocidas ni exposiciones recientes a agentes genotóxicos (por ejemplo, productos, radiaciones ionizantes) a niveles que puedan aumentar la incidencia de fondo de las células micronucleadas. Esto garantizaría una incidencia de fondo de las células micronucleadas baja y constante. La incidencia de base de las células micronucleadas aumenta con la edad y esta tendencia es más pronunciada en las mujeres que en los varones (55). Si se combinan células procedentes de más de un donante, debe especificarse el número de donantes. Es necesario demostrar que las células se han dividido entre el inicio de la administración del producto problema y la recolección de las células. Los cultivos celulares se mantienen en fase exponencial de crecimiento (líneas celulares) o se estimulan para que se dividan (cultivos primarios de linfocitos), a fin de exponer las células en diferentes fases del ciclo celular, ya que es posible que no se conozca la sensibilidad de las distintas fases celulares a los productos problema. Las células primarias que es preciso estimular con agentes mitogénicos para que se dividan dejan generalmente de estar sincronizadas durante la exposición al producto problema (por ejemplo, los linfocitos humanos tras una estimulación mitogénica de 48 horas). La utilización de células sincronizadas durante el tratamiento con el producto problema no es recomendable, pero puede aceptarse si está justificada.

*Medios y condiciones de cultivo*

Para el mantenimiento de los cultivos deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (recipientes de cultivo, atmósfera humidificada y con 5 % de $CO_2$ en su caso, temperatura de 37 °C). Las líneas celulares deben examinarse sistemáticamente para comprobar la estabilidad del número modal de cromosomas y la ausencia de contaminación por *Mycoplasma*, y no deben utilizarse las células que se contaminen o que presenten un cambio en el número modal de cromosomas. Debe determinarse la duración del ciclo celular normal de las líneas celulares o cultivos primarios utilizados en el laboratorio de ensayo, la cual debe ser coherente con las características celulares publicadas.

▼M7

*Preparación de los cultivos*

Líneas celulares: las células se propagan a partir de cultivos madre, se siembran en el medio de cultivo a una densidad tal que las células en suspensión o en monocapas sigan creciendo exponencialmente hasta el momento de la recolección (por ejemplo, debe evitarse la confluencia de las células cultivadas en monocapas).

Linfocitos: se cultiva (p.ej., durante 48 horas en el caso de los linfocitos humanos) sangre completa tratada con anticoagulante (p. ej., heparina) o bien linfocitos separados en presencia de un mitógeno [p. ej., fitohemaglutinina (PHA) en el caso de los linfocitos humanos] a fin de inducir la división celular antes de la exposición al producto problema y a citoB.

*Activación metabólica*

Se debe recurrir a sistemas de metabolización exógenos cuando se utilizan células con una capacidad metabólica endógena inadecuada. El sistema utilizado con más frecuencia que se recomienda por defecto, salvo que se justifique otro sistema, es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene a partir del hígado de roedores (generalmente ratas) tratados con inductores enzimáticos como el aroclor 1254 (56) (57) o una combinación de fenobarbital y b-naftoflavona (58) (59) (60). Esta última combinación no infringe el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (61), y se ha visto que es tan efectiva como el aroclor 1254 para inducir oxidasas de función mixta (58) (59) (60). La fracción S9 se utiliza normalmente a concentraciones que varían entre el 1 y el 2 % (v/v), pero pueden aumentarse hasta el 10 % (v/v) en el medio de ensayo final. Debe evitarse durante el tratamiento el uso de productos que reduzcan el índice mitótico, especialmente productos que acomplejen el calcio (62). La elección del tipo y de la concentración del sistema exógeno de activación metabólica o del inductor metabólico utilizado puede estar influida por la clase de los productos que se someten a ensayo.

*Preparación del producto problema*

Los productos problema sólidos deben prepararse en disolventes adecuados y, si es conveniente, diluirse antes de tratar las células. Los productos problema líquidos pueden añadirse directamente al sistema de ensayo o diluirse antes del tratamiento del sistema de ensayo. Los productos problema gaseosos o volátiles deben someterse a ensayo aplicando modificaciones adecuadas a los protocolos normales, tales como el tratamiento en recipientes de cultivo sellados (63) (64) (65). La preparación del producto problema debe hacerse justo antes del tratamiento, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación.

**Condiciones del ensayo**

*Disolventes*

El disolvente debe elegirse para optimizar la solubilidad de los productos problema sin tener impacto negativo en la realización del ensayo, es decir, cambiar el crecimiento celular, afectar a la integridad del producto problema, reaccionar con los recipientes de cultivo, o interferir con el sistema de activación metabólica. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente (o medio de cultivo) acuoso. Son disolventes bien establecidos el agua o el dimetilsulfóxido (DMSO). En general, los disolventes orgánicos no deben exceder del 1 % (v/v). Si se disuelve la citoB en DMSO, el conjunto de disolvente orgánico utilizado para el producto problema y para la citoB no debe superar el 1 % (v/v); en caso contrario, deben utilizarse testigos sin tratar, a fin de garantizar que el porcentaje de disolvente orgánico no tiene ningún efecto adverso. Los disolventes acuosos (solución salina o agua) no deben

▼M7

superar el 10 % (v/v) en el medio de tratamiento final. Si se utilizan disolventes distintos de los que están bien establecidos (por ejemplo, etanol o acetona), debe disponerse de datos justificativos que indiquen su compatibilidad con el sistema de ensayo y el producto problema, y su ausencia de toxicidad genética a la concentración utilizada. En ausencia de estos datos justificativos, es importante incluir testigos sin tratar (véase el apéndice 1), así como testigos del disolvente para demostrar que el disolvente elegido no induce efectos nocivos ni cromosómicos (p. ej., aneuploidía o clastogenicidad).

*Utilización de citoB como bloqueante de la citocinesis*

Una de las consideraciones más importantes en la realización del ensayo MNvit es la de velar por que las células que se examinen hayan completado la mitosis durante el tratamiento o en el período de incubación tras el mismo, en su caso. Así pues, el recuento de micronúcleos debe limitarse a las células que han experimentado la mitosis durante el tratamiento o después de este. La citoB es el agente más ampliamente utilizado para bloquear la citocinesis, ya que inhibe el ensamblaje de la actina, con lo que impide la separación de las células hijas tras la mitosis, y así se forman células binucleadas (6) (66) (67). El efecto del producto problema sobre la cinética de proliferación celular puede medirse simultáneamente, cuando se utiliza la citoB. La citoB debe utilizarse como bloqueante de la citocinesis cuando se utilizan linfocitos humanos, ya que la duración de los ciclos celulares es variable entre los donantes, y debido a que no todos los linfocitos responden a la estimulación con PHA. El uso de citoB no es obligatorio con los demás tipos de células si se puede establecer que han sufrido división como se describe en el punto 27. Por otra parte, la citoB no se utiliza generalmente cuando se evalúa la presencia de micronúcleos en las muestras utilizando métodos citométricos.

La concentración adecuada de citoB debe determinarse en el laboratorio para cada tipo celular a fin de conseguir la frecuencia óptima de células binucleadas en los cultivos de testigo de disolvente y debe demostrarse que proporciona un buen rendimiento de células binucleadas para la evaluación. La concentración adecuada de citoB está generalmente entre 3 y 6 μg/ml (19).

*Medición de la proliferación celular y de la citotoxicidad, y selección de las concentraciones de tratamiento*

Al determinar la concentración máxima de producto problema, debe evitarse llegar a concentraciones que puedan producir respuestas positivas falsas, tales como las que provocan una citotoxicidad excesiva (véase el punto 29), precipitación en el medio de cultivo (véase el punto 30), o cambios marcados del pH o de la osmolalidad (véase el punto 9). Si el producto problema provoca un cambio marcado en el pH del medio en el momento de su adición, el pH puede ajustarse amortiguando el medio de tratamiento final para evitar resultados positivos falsos y mantener unas condiciones de cultivo adecuadas.

Se mide la proliferación celular para asegurarse de que un número suficiente de células tratadas ha sufrido mitosis durante el ensayo y de que los tratamientos se efectúan a los niveles adecuados de citotoxicidad (véase el punto 29). La citotoxicidad debe determinarse en el experimento principal con y sin activación metabólica, utilizando un indicador adecuado de la muerte y del crecimiento de las células (véanse los puntos 26 y 27). Si bien la evaluación de la citotoxicidad en un ensayo preliminar inicial puede ser útil para definir mejor las concentraciones que deben utilizarse en el experimento principal, no es obligatorio efectuar un ensayo inicial. Si se lleva a cabo, no debe sustituir a la medición de la citotoxicidad en el experimento principal.

El tratamiento de los cultivos con citoB, junto con la medición de las frecuencias relativas de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas en el cultivo, constituye un método exacto de cuantificación del efecto sobre la proliferación celular y de la actividad citotóxica o citostática de un tratamiento (6), y garantiza que solamente se evalúan al microscopio las células que se han dividido durante el tratamiento o después de este. Se recomienda utilizar el índice de proliferación

▼M7

con bloqueo citocinético (IPBC) (6) (27) (68) o el índice de replicación (IR) de, al menos, 500 células por cultivo (véanse las fórmulas en el apéndice 2) para estimar la actividad citotóxica y citostática de un tratamiento comparando los valores obtenidos en los cultivos tratados y en los testigos. La evaluación de otros indicadores de citotoxicidad (por ejemplo, integridad celular, apoptosis, necrosis, recuento de las células en metafase, ciclo celular) puede aportar información útil, pero no debe utilizarse en lugar del IPBC o del IR.

En los estudios sin citoB, es necesario demostrar que las células en cultivo se han dividido, de modo que una parte sustancial de las células analizadas hayan sufrido división durante el tratamiento con el producto problema o tras él; en caso contrario, pueden obtenerse respuestas negativas falsas. Para evaluar la actividad citotóxica y citostática de un tratamiento, se recomienda recurrir a la medición de la duplicación relativa de la población (DRP) o del aumento relativo del recuento celular (ARRC) (17) (68) (69) (70) (71) (véanse las fórmulas en el apéndice 2). Con unos tiempos de muestreo ampliados (por ejemplo, tratamiento durante 1,5-2 veces la duración del ciclo celular normal y recolección después de otras 1,5-2 veces la duración del ciclo celular normal, lo que llevaría a tiempos de muestreo superiores a 3-4 veces la duración del ciclo celular normal en total, como se describe en los puntos 38 y 39), la DRP podría subestimar la citotoxicidad (71). En tales circunstancias, puede ser preferible medir el ARRC, o puede ser útil evaluar la citotoxicidad tras un tiempo igual a 1,5-2 veces la duración del ciclo celular normal. La evaluación de otros indicadores de citotoxicidad o citostasis (por ejemplo, integridad celular, apoptosis, necrosis, recuento de las células en metafase, índice de proliferación (IP), ciclo celular, puentes nucleoplásmicos o yemas nucleares) puede aportar información útil, pero no debe utilizarse en lugar de la DRP o del ARRC.

Deben evaluarse al menos tres concentraciones de ensayo (sin incluir los testigos positivos y de disolvente) que cumplan los criterios de aceptabilidad (citotoxicidad apropiada, número de células, etc.). Cualquiera que sea el tipo de células (líneas celulares o cultivos primarios de linfocitos), pueden utilizarse a cada concentración de ensayo cultivos tratados replicados o sin replicar. Si bien se recomienda el uso de cultivos duplicados, también son aceptables los cultivos sin replicar, siempre que se examine el mismo número total de células, sea en cultivos duplicados o sin replicar. La utilización de cultivos sin replicar es especialmente pertinente cuando se evalúan más de tres concentraciones (véanse los puntos 44-45). Los resultados obtenidos en los cultivos replicados independientes a una concentración determinada se pueden poner en común para el análisis de los datos. En el caso de productos problema que muestren escasa o nula citotoxicidad, normalmente serán adecuados los intervalos de concentración de aproximadamente el doble o el triple. Cuando se produce citotoxicidad, las concentraciones de ensayo seleccionadas deben cubrir una gama a partir de la que provoca citotoxicidad según se describe en el punto 29, con inclusión en particular de las concentraciones a las que existe citotoxicidad moderada y débil o nula. Muchos productos problema presentan curvas de respuesta a la concentración de elevada pendiente y, con el fin de obtener datos a niveles bajos y moderados de citotoxicidad o de estudiar en detalle la relación entre dosis y respuesta, en tales casos es necesario recurrir a concentraciones más próximas entre sí o a más de tres concentraciones (cultivos replicados o sin replicar), en particular en situaciones en que se requiere una repetición del experimento (véase el punto 60).

Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, la concentración más elevada debe aspirar a provocar un 55 ± 5 % de citotoxicidad utilizando los parámetros recomendados de citotoxicidad (es decir, reducción del ARRC y de la DRP con líneas celulares cuando no se utiliza la citoB, y reducción del IPBC o del IR cuando se utiliza la citoB, al 45 ± 5 % del testigo negativo en paralelo) (72). Ha de tenerse cuidado al interpretar resultados positivos que solo se encuentren en el extremo superior de este intervalo de citotoxicidad del 55 ± 5 % (71).

▼M7

Para los productos problema poco solubles que no son citotóxicos a concentraciones inferiores a la concentración mínima insoluble, la mayor concentración analizada debe producir turbidez o precipitado visibles a simple vista o con ayuda de un microscopio invertido al final del tratamiento con el producto problema. Incluso si se produce citotoxicidad por encima de la concentración mínima insoluble, es aconsejable hacer el ensayo a una única concentración que produzca turbidez o precipitado visible porque este puede provocar efectos falsos. A la concentración que produce precipitado, se debe evitar que este interfiera con la realización del ensayo (por ejemplo, con la tinción o el examen celular). Puede ser útil determinar la solubilidad en el medio de cultivo antes de que efectuar el experimento.

Si no se observa precipitado ni citotoxicidad limitante, la concentración de ensayo más elevada debe corresponder a la más baja de las siguientes: 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml (73) (74) (75). Si el producto problema no tiene una composición definida y se trata, por ejemplo, de sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos (UVCB) (76), extractos medioambientales, etc., es posible que la concentración superior tenga que ser mayor (por ejemplo, 5 mg/ml), en ausencia de citotoxicidad suficiente, para aumentar la concentración de cada uno de los componentes. Conviene señalar, no obstante, que estos requisitos pueden variar en caso de medicamentos de uso humano (93).

*Testigos*

Se incluirán, para cada período de recolección, testigos negativos en paralelo (véase el punto 21), consistentes en el disolvente solo en el medio de tratamiento y sometidos al mismo proceso que los cultivos tratados.

Es necesario disponer testigos positivos en paralelo a fin de demostrar la capacidad del laboratorio para detectar clastógenos y anéugenos en las condiciones establecidas en el protocolo de ensayo utilizado y la efectividad del sistema exógeno de activación metabólica, si procede. En el cuadro 1 a continuación se encuentran ejemplos de testigos positivos. Es posible utilizar como testigos positivos otros productos, si se justifica.

Por el momento, no se conoce ningún anéugeno que necesite activación metabólica para su actividad genotóxica (17). Debido a que los ensayos de toxicidad genética con células de mamífero *in vitro* están suficientemente normalizados respecto a los tratamientos a corto plazo realizados en paralelo, con y sin activación metabólica, utilizando la misma duración del tratamiento, el uso de testigos positivos puede limitarse a un clastógeno que requiera activación metabólica. En este caso, una sola respuesta clastogénica de un testigo positivo demostrará tanto la actividad del sistema de activación metabólica como la sensibilidad del sistema de ensayo. No obstante, los tratamientos a largo plazo (sin fracción S9) deben tener su propio testigo positivo, ya que la duración del tratamiento será diferente de la del ensayo con activación metabólica. Si se selecciona un clastógeno como único testigo positivo en un tratamiento a corto plazo con y sin activación metabólica, debe seleccionarse un anéugeno para el tratamiento a largo plazo sin activación metabólica. Deben utilizarse testigos positivos tanto en cuanto a la clastogenicidad como en cuanto a la aneugenicidad con células competentes metabólicamente que no requieren S9.

Cada testigo positivo debe utilizarse a una o varias concentraciones de las que quepa esperar que produzcan incrementos reproducibles y detectables respecto a los valores de fondo para demostrar la sensibilidad del sistema de ensayo (es decir, que los efectos sean claros, pero sin revelar inmediatamente al lector la identidad de los portaobjetos codificados), y la respuesta no debe verse comprometida por una citotoxicidad que exceda de los límites especificados en este método de ensayo.

▼M7

*Cuadro 1.*

**Productos de referencia recomendados para evaluar la competencia del laboratorio, y para la selección de los testigos positivos.**

| Categoría | Producto | CAS RN |
|---|---|---|
| 1. **Clastógenos activos sin activación metabólica** | | |
| | Metanosulfonato de metilo | 66-27-3 |
| | Mitomicina C | 50-07-7 |
| | N-Óxido de 4-nitroquinolina | 56-57-5 |
| | Arabinósido de citosina | 147-94-4 |
| 2. **Clastógenos que necesitan activación metabólica** | | |
| | Benzo(a)pireno | 50-32-8 |
| | Ciclofosfamida | 50-18-0 |
| 3. **Anéugenos** | | |
| | Colchicina | 64-86-8 |
| | Vimblastina | 143-67-9 |

PROCEDIMIENTO

**Pauta de tratamiento**

Para maximizar la probabilidad de detectar un anéugeno o un clastógeno que actúe en una fase específica del ciclo celular, es importante que se trate con el producto problema un número suficiente de células que representen todas las diferentes fases de sus ciclos celulares. Todos los tratamientos deben iniciarse y terminarse mientras las células están en fase de crecimiento exponencial y las células deben seguir creciendo hasta el momento de la toma de muestras. Por tanto, la pauta de tratamiento de líneas celulares y de cultivos celulares primarios puede diferir en algunos aspectos respecto a la aplicada a los linfocitos que requieren estimulación mitogénica para empezar su ciclo celular (17). En el caso de los linfocitos, el enfoque más eficiente es iniciar el tratamiento con el producto problema a las 44-48 horas tras la estimulación con PHA, cuando las células se estén dividiendo de forma asíncrona (6).

Los datos publicados (19) indican que la mayoría de los anéugenos y clastógenos se detectan con un corto período de tratamiento, de entre 3 y 6 horas, en presencia y ausencia de S9, seguido de la eliminación del producto problema, y con la toma de muestras a un tiempo equivalente a unas 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal desde el inicio del tratamiento (7).

Sin embargo, para una evaluación a fondo, que sería necesaria para deducir un resultado negativo, deben aplicarse las tres condiciones experimentales siguientes, utilizando un tratamiento a corto plazo con y sin activación metabólica y un tratamiento a largo plazo sin activación metabólica (véanse los puntos 56, 57 y 58):

— Las células deben exponerse al producto problema sin activación metabólica durante 3 a 6 horas, y recolectarse cuando haya transcurrido un período de aproximadamente 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal desde el inicio del tratamiento (19).

— Las células deben exponerse al producto problema con activación metabólica durante 3 a 6 horas, y recolectarse cuando haya transcurrido un período de aproximadamente 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal desde el inicio del tratamiento (19).

▼M7

— Las células deben exponerse continuamente sin activación metabólica hasta la recolección tras un período de aproximadamente 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal.

En caso de que alguna de las anteriores condiciones experimentales conduzca a una respuesta positiva, puede no ser necesario investigar los otros regímenes de tratamiento.

Si se sabe o se sospecha que el producto problema afecta a la duración del ciclo celular (por ejemplo, cuando se someten a ensayo análogos de nucleósidos), especialmente en el caso de células competentes para p53 (35) (36) (77), los tiempos de toma de muestras o de recuperación pueden ampliarse hasta un nuevo período de 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal (es decir, un total de 3,0 a 4,0 veces la duración del ciclo celular desde el inicio de los tratamientos a corto y a largo plazo). Estas opciones se refieren a situaciones en que puede haber preocupación respecto a posibles interacciones entre el producto problema y la citoB. Cuando se utilizan tiempos de muestreo ampliados (es decir, un total de 3,0 a 4,0 veces la duración del ciclo celular), conviene asegurarse de que las células se siguen dividiendo aún activamente. Por ejemplo, en el caso de los linfocitos, el crecimiento exponencial podría declinar a las 96 horas de la estimulación y pueden convertirse en confluentes los cultivos en monocapas.

Las pautas sugeridas de tratamiento celular se resumen en el cuadro 2. Estas pautas generales de tratamiento pueden modificarse (lo que debería justificarse) en función de la estabilidad o reactividad del producto problema o de las características particulares de crecimiento de las células utilizadas.

*Cuadro 2.*

**Tratamiento celular y tiempos de recogida para el ensayo MNvit**

| | | |
|---|---|---|
| Linfocitos, células primarias y líneas celulares tratadas con citoB | + S9<br>Tratamiento prolongado | Tratar durante 3-6 horas en presencia de S9;<br>retirar la fracción S9 y el medio de tratamiento;<br>añadir medio fresco y citoB;<br>recolectar cuando haya pasado 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal desde el inicio del tratamiento. |
| | – S9<br>Tratamiento prolongado | Tratar durante 3-6 horas;<br>retirar el medio de tratamiento;<br>añadir medio fresco y citoB;<br>recolectar cuando haya pasado 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal desde el inicio del tratamiento. |
| | – S9<br>Tratamiento prolongado | Tratar durante 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal en presencia de citoB;<br>recolectar al final del período de tratamiento. |
| Líneas celulares tratadas sin citoB<br>(igual que las pautas de tratamiento indicadas más arriba, salvo que no se añade citoB) | | |

En los cultivos de monocapas, es posible que haya células mitóticas (identificables por su forma redondeada y por despegarse de la superficie) al final del tratamiento de 3-6 horas. Como estas células mitóticas se despegan con facilidad, pueden perderse cuando se retira el medio que contiene el producto problema. Si hay pruebas de un aumento sustancial del número de células mitóticas en comparación con los testigos, lo que indica una probable detención mitótica, las células deben recogerse por centrifugación y volver a añadirse al cultivo, para evitar la pérdida de células que estén en mitosis, y que podrían presentar micronúcleos o aberraciones cromosómicas, en el momento de la recolección.

▼M7

**Recolección de las células y preparación de los portaobjetos**

Cada cultivo debe recogerse y manipularse por separado. La preparación de las células puede implicar un tratamiento hipotónico, pero esta fase no es necesaria si se consigue de otra manera una extensión adecuada de las células. Pueden usarse distintas técnicas para la preparación de los portaobjetos, siempre que lleven a la obtención de preparaciones celulares de buena calidad para su evaluación. Deben seleccionarse células con la membrana celular intacta y el citoplasma intacto para poder detectar los micronúcleos y (en el método de bloqueo de la citocinesis) poder identificar de forma fiable las células binucleadas.

Las preparaciones pueden teñirse siguiendo varios métodos, tales como la tinción de Giemsa o la aplicación de colorantes fluorescentes específicos del ADN. Si se emplean colorantes fluorescentes apropiados [p. ej., naranja de acridina (78) o Hoechst 33258 más pironina-Y (79)] pueden evitarse algunos de los artefactos que aparecen cuando se utiliza un colorante no específico del ADN. Pueden utilizarse anticuerpos anti-cinetocoros, la técnica FISH con sondas pancentroméricas de ADN, o el etiquetado *in situ* cebado con cebadores pancentroméricos específicos, junto con una tinción de contraste adecuada del ADN, para determinar el contenido de micronúcleos (se teñirán los cromosomas enteros, mientras que los fragmentos cromosómicos acéntricos quedarán sin teñir) si resulta interesante disponer de información sobre el mecanismo de su formación (16) (17). Pueden utilizarse otros métodos para diferenciar entre clastógenos y aneúgenos, siempre que se haya comprobado que son efectivos y están validados. Por ejemplo, en el caso de ciertas líneas celulares, también podrían aportar información útil las mediciones de núcleos sub-2N como fenómenos de hipodiploidía utilizando técnicas tales como el análisis de imágenes, la citometría de barrido por láser o la citometría de flujo (80) (81) (82). Las observaciones morfológicas de los núcleos podrían aportan también indicaciones de posible aneuploidía. Por otra parte, un ensayo de aberraciones cromosómicas en metafase, preferiblemente con el mismo tipo de células y un protocolo de sensibilidad comparable, también podría ser una forma útil de determinar si los micronúcleos se deben a la rotura de cromosomas (sabiendo que la pérdida de cromosomas no se detectaría en el ensayo de aberraciones cromosómicas).

**Análisis**

Todos los portaobjetos, incluidos los de los testigos del disolvente, de la muestra sin tratar (en su caso) y los positivos, reciben un código independiente antes de analizar al microscopio las frecuencias de los micronúcleos. Conviene utilizar técnicas adecuadas para controlar todo eventual sesgo o deriva cuando se utilice un sistema de examen automatizado como, por ejemplo, la citometría de flujo, la citometría de barrido por láser o el análisis de imágenes. Con independencia del programa automatizado que se utilice para enumerar los micronúcleos, deben evaluarse de manera simultánea el IPBC, el IR, la DRP o el ARRC.

En los cultivos tratados con citoB, deben analizarse las frecuencias de los micronúcleos en al menos 2 000 células binucleadas por cada concentración y testigo (83), divididas a partes iguales entre las réplicas, si se utilizan estas. En caso de realizarse un solo cultivo por dosis (véase el punto 28), deben evaluarse al menos 2 000 células binucleadas en ese cultivo único (83). Si para el examen a cada concentración se dispone de un número sustancialmente inferior a 1 000 células binucleadas por cultivo (en caso de cultivos duplicados), o a 2 000 (en caso de cultivos únicos), y si no se detecta un aumento significativo de la frecuencia de los micronúcleos, debe repetirse el ensayo utilizando más células, o unas concentraciones menos citotóxicas, según sea más conveniente. Ha de procurarse no tener en cuenta para el examen las células binucleadas con formas irregulares o en las que los dos núcleos difieran mucho por su tamaño. Por otra parte, no deben confundirse las células binucleadas con células multinucleadas mal extendidas. Las células que contengan más de dos núcleos principales no deben examinarse en cuanto a los micronúcleos, ya que la frecuencia de micronúcleos de base puede ser más elevada en estas células (84). Es aceptable el examen de células mononucleadas si se demuestra que el producto problema

▼M7

interfiere con la actividad de la citoB. Un segundo ensayo sin citoB podría ser útil en tales casos. El examen de células mononucleadas, además del de las células binucleadas, puede aportar información útil (85) (86), pero no es obligatorio realizarlo.

En el caso de las líneas celulares estudiadas sin tratamiento con citoB, deben examinarse los micronúcleos en al menos 2 000 células por cada concentración y testigo (83), divididas a partes iguales entre las réplicas, si se utilizan estas. Cuando se utiliza un solo cultivo por concentración (véase el punto 28), deben examinarse al menos 2 000 células de este cultivo único. Si para el examen a cada concentración se dispone de un número sustancialmente inferior a 1 000 células por cultivo (en caso de cultivos duplicados), o a 2 000 (en caso de cultivos únicos), y si no se detecta un aumento significativo de la presencia de micronúcleos, debe repetirse el ensayo utilizando más células, o unas concentraciones menos citotóxicas, según sea más conveniente.

Cuando se utiliza la citoB, para evaluar la proliferación celular hay que determinar el IPBC o el IR (véase el apéndice 2) basándose en un mínimo de 500 células por cultivo. Cuando se hacen los tratamientos en ausencia de citoB, es fundamental aportar pruebas de que las células del cultivo se han dividido, como se indica en los puntos 24-28.

**Competencia del laboratorio**

Con el fin de conseguir la suficiente experiencia con el ensayo antes de su uso para los ensayos sistemáticos, el laboratorio debe haber efectuado una serie de experimentos con productos positivos de referencia que actúen a través de mecanismos diferentes (como mínimo, uno con y otro sin activación metabólica, y uno que actúe a través de un mecanismo aneugénico, seleccionados de entre los productos químicos enumerados en el cuadro 1) y con diversos testigos negativos (incluidos los cultivos sin tratar y diferentes disolventes o vehículos). Las respuestas obtenidas con estos testigos positivos y negativos deben ser coherentes con la bibliografía. Esto no es aplicable a los laboratorios que tienen experiencia, esto es, que disponen de una base de datos históricos, según se define en los puntos 49-52.

Debe investigarse una selección de productos testigo positivos (véase el cuadro 1) con tratamientos cortos y largos en ausencia de activación metabólica, y también con tratamientos cortos en presencia de activación metabólica, para demostrar su capacidad de detectar productos clastogénicos y aneugénicos, determinar la efectividad del sistema de activación metabólica y demonstrar la adecuación de los procedimientos de examen (análisis visual microscópico, citometría de flujo, citometría de barrido por láser o análisis de imágenes). Debe elegirse una gama de concentraciones de los productos seleccionados de forma que produzcan aumentos sobre el nivel de fondo relacionados con la concentración y reproducibles para demostrar la sensibilidad y el intervalo dinámico del sistema de ensayo.

**Datos sobre testigos históricos**

El laboratorio debe determinar:

— un intervalo y una distribución de los testigos positivos históricos,

— un intervalo y una distribución de los testigos negativos (sin tratar, disolventes) históricos.

Cuando se obtengan datos por primera vez en relación con la distribución de testigos negativos históricos, los testigos negativos en paralelo deben ser coherentes con los datos publicados de los testigos negativos, si existen. Según se añadan más datos experimentales sobre la distribución de los testigos, los testigos negativos en paralelo deben situarse idealmente dentro de los límites de control del 95 % de dicha distribución (87) (88). La base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio debe constituirse en un principio con un mínimo de 10 experimentos, pero preferiblemente con al menos 20 experimentos realizados en condiciones experimentales comparables. Los laboratorios deben utilizar métodos

▼M7

de control de calidad, como gráficos de control [por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (88)], con el fin de determinar la variabilidad de sus datos sobre los testigos positivos y negativos, y de demostrar que la metodología está «controlada» en su laboratorio (83). En la bibliografía pueden encontrarse más recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (es decir, criterios de inclusión y exclusión de datos en los datos históricos y criterios de aceptabilidad para un determinado experimento) (87).

Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de la coherencia de los datos con las bases de datos de testigos históricos existentes del laboratorio. Cualquier incoherencia importante debería dar lugar a la creación de una nueva base de datos de testigos históricos.

Los datos sobre los testigos negativos deben consistir en la incidencia de células micronucleadas procedentes de un solo cultivo o de la suma de cultivos replicados como se describe en el punto 28. Lo ideal sería que los testigos negativos en paralelo estuvieran dentro de los límites de control del 95 % de la distribución de la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio (87) (88). Cuando hay datos de los testigos negativos en paralelo que quedan fuera de los límites de control del 95 %, su inclusión en la distribución de testigos históricos puede ser aceptable en la medida en que dichos datos no sean valores discrepantes extremos y haya pruebas de que el sistema de ensayo está «controlado» (véase el punto 50) y pruebas de la ausencia de fallos técnicos o humanos.

DATOS E INFORME

**Presentación de los resultados**

Si se utiliza la técnica de bloqueo de la citocinesis, para la evaluación de la inducción de micronúcleos se emplearán solo las frecuencias de las células binucleadas con micronúcleos (independientemente del número de micronúcleos por célula). El resultado del número de células con uno, dos o más micronúcleos puede notificarse por separado, lo que puede aportar información útil, pero no es obligatorio hacerlo así.

También deben medirse en paralelo la citotoxicidad o la citostasis para todos los cultivos tratados y los testigos negativos y positivos (16). Los valores del IPBC y del IR deben calcularse para todos los cultivos tratados y testigos, como medidas del retraso del ciclo celular cuando se utiliza el método de bloqueo de la citocinesis. En ausencia de citoB, debe utilizarse la DRP o el ARRC (véase el apéndice 2).

Deben proporcionarse datos de cada cultivo. Además, se resumirán todos los datos en forma de cuadro.

**Criterios de aceptabilidad**

La aceptabilidad de un ensayo se basa en los criterios siguientes:

— El testigo negativo en paralelo se considera aceptable para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio de acuerdo con lo descrito en el punto 50.

— Los testigos positivos en paralelo (véase el punto 50) deben inducir respuestas compatibles con las obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos del laboratorio y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo.

— Deben cumplirse los criterios de proliferación celular en el testigo del disolvente (puntos 25-27).

— Se han sometido a ensayo todas las condiciones experimentales, a menos que una haya dado lugar a resultados positivos (puntos 36-40).

— Es analizable un número apropiado de células y de concentraciones (puntos 28 y 44-46).

▼M7

— Los criterios de selección de la concentración superior son coherentes con los descritos en los puntos 24-31.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si, en alguna de las condiciones experimentales examinadas (véanse los puntos 36-39):

— al menos una de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo (89),

— el aumento está relacionado con la dosis en al menos una condición experimental cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada (véase el punto 28),

— alguno de los resultados está fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 52).

Cuando se cumplen todos estos criterios, el producto problema se considera capaz de inducir roturas, aumentos o pérdidas de cromosomas en este sistema de ensayo. En la bibliografía se encuentran también recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (90) (91) (92).

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas (véanse los puntos 36-39):

— ninguna de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

— no hay ningún aumento relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

— todos los resultados están dentro de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límites de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 52).

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir roturas, aumentos o pérdidas de cromosomas en este sistema de ensayo. En la bibliografía se encuentran también recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (90) (91) (92).

No se requiere ninguna verificación de una respuesta positiva o negativa clara.

En caso de que la respuesta no sea ni claramente positiva ni claramente negativa como se describe más arriba, o a fin de ayudar a determinar la relevancia biológica de un resultado, los datos deben ser evaluados por expertos o mediante más investigaciones. Puede ser útil examinar células adicionales (en su caso) o realizar una repetición del experimento modificando las condiciones experimentales, como, por ejemplo, la separación entre concentraciones u otras condiciones de activación metabólica (es decir, concentración u origen de la fracción S9).

En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos puede no permitir que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo, por lo que se considerará dudoso.

Los productos problema que inducen micronúcleos en el ensayo MNvit pueden deber esta propiedad a su capacidad de inducir rotura cromosómica, pérdida de cromosomas, o una combinación de ambas. Para determinar si el mecanismo de inducción de micronúcleos se debe a actividad clastogénica y/o aneugénica, pueden realizarse otros análisis utilizando anticuerpos anti-cinetocoro, sondas *in situ* específicas del centrómero, u otros métodos.

▼M7

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

— estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

— reactividad del producto problema con el disolvente o vehículo o con el medio de cultivo de las células;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

— medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

*Sustancia con un solo componente:*

— aspecto físico, hidrosolubilidad, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.

*Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas:*

— en la medida de lo posible, caracterizadas por la identidad química (véase más arriba), presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes.

*Disolvente:*

— justificación de la elección del disolvente;

— porcentaje de disolvente en el medio de cultivo final.

*Células:*

— tipo y procedencia de las células utilizadas;

— idoneidad del tipo de células utilizado;

— ausencia de micoplasmas, en el caso de las líneas celulares;

— en el caso de las líneas celulares, información sobre la duración del ciclo celular o el índice de proliferación;

— cuando se utilicen linfocitos, sexo de los donantes de sangre, edad y cualquier información pertinente sobre los donantes, sangre completa o linfocitos aislados y mitógeno empleado;

— duración del ciclo celular normal (testigo negativo);

— número de pases, si se conoce, en el caso de las líneas celulares;

— métodos de mantenimiento de los cultivos celulares, en el caso de las líneas celulares;

— número modal de cromosomas, en el caso de las líneas celulares.

▼M7

*Condiciones de ensayo:*

— identidad de la sustancia de bloqueo de la citocinesis (por ejemplo, citoB), si se utiliza, y su concentración, junto con la duración de la exposición de las células;

— concentración del producto problema, expresada como concentración final en el medio de cultivo (por ejemplo, µg o mg/ml, o mM, de medio de cultivo);

— justificación de la selección de las concentraciones y del número de cultivos, incluidos los datos de citotoxicidad y los límites de solubilidad;

— composición de los medios, concentración de $CO_2$ si procede, nivel de humedad;

— concentración (o volumen) del disolvente y del producto problema añadidos al medio de cultivo;

— temperatura y duración de la incubación;

— duración del tratamiento;

— momento de la recolección tras el tratamiento;

— densidad celular en el momento de la siembra, si procede;

— tipo y composición del sistema de activación metabólica: origen de la fracción S9, método de preparación de la mezcla S9, concentración o volumen de mezcla S9 y de fracción S9 en el medio de cultivo final, controles de calidad de la fracción S9 (p. ej., actividad enzimática, esterilidad, capacidad metabólica);

— productos testigo positivos y negativos, concentraciones finales, condiciones y duración de los períodos de tratamiento y de recuperación;

— métodos de preparación de los portaobjetos y técnica de tinción utilizados;

— criterios de examen de células micronucleadas (selección de las células analizables e identificación de micronúcleos);

— números de células analizadas;

— métodos de medición de la citotoxicidad;

— cualquier información adicional relativa a la citotoxicidad y método utilizado;

— criterios empleados para considerar si los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos;

— métodos utilizados de análisis estadístico;

— métodos, tales como la utilización de anticuerpos anti-cinetocoro o de sondas pan-centroméricas específicas, para caracterizar si los micronúcleos contienen cromosomas completos o fragmentados, en su caso;

— métodos utilizados para determinar el pH, la osmolalidad y la precipitación.

*Resultados:*

— definición de células aceptables para el análisis;

— en ausencia de citoB, número de células tratadas y número de células recolectadas de cada cultivo cuando se utilizan líneas celulares;

▼M7

— parámetro utilizado para medir la citotoxicidad como, por ejemplo, IPBC o IR en caso de aplicación de bloqueo citocinético, o ARRC o DRP cuando no se aplica este bloqueo; otras observaciones eventuales como, p. ej., confluencia celular, apoptosis, necrosis, recuento en metafase, frecuencia de células binucleadas;

— signos de precipitación y momento de la determinación;

— datos sobre el pH y la osmolalidad del medio de tratamiento, si se han determinado;

— distribución de las células mono, bi y multinucleadas si se utiliza un método de bloqueo de la citocinesis;

— número de células con micronúcleos, indicado por separado para cada cultivo tratado y de testigo, precisándose si corresponden a células binucleadas o mononucleadas, en su caso;

— relación concentración-respuesta, cuando sea posible;

— datos de los testigos negativos (disolvente) y positivos (concentraciones y disolventes) en paralelo;

— datos históricos de los testigos negativos (disolvente) y positivos, con intervalos, medias y desviación típica y límites de control del 95 % para la distribución, así como el número de datos;

— análisis estadístico; valores p, si se dispone de ellos.

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones*

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(2) Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 1-4.

(3) Parry, J.M., A. Sors (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project. *Mutation Research*, Vol. 287/1, pp. 3-15.

(4) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios,* Vol. 43/172-173, pp. 233-246.

(5) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2000). Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 167-172.

(6) Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols,* Vol. 2/5, pp. 1084-1104.

(7) Fenech, M., A.A. Morley (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research,* Vol. 161/2, pp. 193-198.

(8) Eastmond, D.A., J.D. Tucker (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 13/1, pp. 34-43.

▼M7

(9) Eastmond, D.A., D. Pinkel (1990). Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probe. *Mutation Research,* Vol. 234/5, pp. 9-20.

(10) Miller, B.M. *et al*. (1991). Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA. *Mutagenesis,* Vol. 6/4, pp. 297-302.

(11) Farooqi, Z., F. Darroudi, A. T. Natarajan (1993). The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis,* Vol. 8/4, pp. 329-334.

(12) Migliore, L. *et al*. (1993). Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe. *Mutation Research,* Vol. 319/3, pp. 205-213.

(13) Norppa, H., L. Renzi, C. Lindholm (1993). Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization. *Mutagenesis,* Vol. 8/6, pp. 519-525.

(14) Eastmond, D.A, D.S. Rupa, L.S. Hasegawa (1994). Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Research,* Vol. 322/1, pp. 9-20.

(15) Marshall, R.R. *et al*. (1996). Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutation Research,* Vol. 372/2, pp. 233-245.

(16) Zijno, P. *et al*. (1996). Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 372/2, 211-219.

(17) Kirsch-Volders *et al*. (2003). Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Research,* Vol. 540/2, pp. 153-163.

(18) Capítulo B.10 del presente anexo: *Ensayo de aberraciones cromosómicas en mamíferos* in vitro.

(19) Lorge, E. *et al*. (2006). SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 13-36.

(20) Clare, G. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 37-60.

(21) Aardema, M.J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 61-87.

(22) Wakata, A. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 88-124.

(23) Oliver, J. *et al*. (2006). SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 125-152.

(24) Albertini, S. *et al*. (1997). Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 187-208.

(25) Miller, B. *et al*. (1997). Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 45-59.

▼M7

(26) Miller, B. *et al*. (1998). Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Research,* Vol. 410, pp. 81-116.

(27) Kalweit, S. *et al*. (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells — comparison of three different test approaches. *Mutation Research,* Vol. 439/2, pp. 183-190.

(28) Kersten, B. *et al*. (1999). The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutation Research,* Vol. 445/1, pp. 55-71.

(29) von der Hude, W. *et al*. (2000). *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells — results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances. *Mutation Res*earch, Vol. 468/2, pp. 137-163.

(30) Garriott, M.L., J.B. Phelps, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 517/1-2, pp. 123-134.

(31) Matsushima, T. *et al*. (1999). Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis,* Vol. 14/6, pp. 569-580.

(32) Elhajouji, A., E. Lorge (2006). Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research,* Vol. 607/1, pp. 1-152.

(33) Kirkland, D. (2010). Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro*micronucleus test (MNVit): Introduction to the collaborative trial. *Mutation Res*earch, Vol. 702/2, pp. 139-147.

(34) Hashimoto K. *et al*. (2011). Comparison of four different treatment conditions of extended exposure in the *in vitro* micronucleus assay using TK6 lymphoblastoid cells. *Regulatory Toxicology and Pharmacol*ogy, Vol. 59/1, pp. 28-36.

(35) Honma, M., M. Hayashi (2011). Comparison of *in vitro* micronucleus and gene mutation assay results for p53-competent versus p53-deficient human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 373-384.

(36) Zhang, L.S. *et al*. (1995). A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test. *Mutation Research Letters,* Vol. 347/3-4, pp. 105-115.

(37) CEVMA (2006). Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. ESAC 25th meeting, 16-17 November 2006, Available at: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(38) ESAC (2006). ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the *In Vitro* Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. Disponible en: http://ecvam.jrc.it/index.htm.

(39) Corvi, R. *et al*. (2008). ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT). *Mutagenesis,* Vol 23/4, pp. 271-283.

(40) ILSI paper (draft). Lorge, E., M.M. Moore, J. Clements, M. O'Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, A. Sutter, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Young-Tannir. Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. *Mutation Research.*

▼**M7**

(41) Scott, D. *et al*. (1991). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. *Mutation Research,* Vol. 257/2, pp. 147-205.

(42) Morita, T. *et al*. (1992). Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research,* Vol. 268/2, pp. 297-305.

(43) Brusick, D. (1986). Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 8/6, pp. 789-886.

(44) Long, L.H. *et al*. (2007). Different cytotoxic and clastogenic effects of epigallocatechin gallate in various cell-culture media due to variable rates of its oxidation in the culture medium. *Mutation Research,* Vol. 634/1-2, pp. 177-183.

(45) Nesslany, F. *et al*. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. *Environmental and Molecular Mutation.*, Vol. 49, pp. 439-452.

(46) Fenech, M., A.A. Morley (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research,* Vol. 147/1-2, pp. 29-36.

(47) Fenech, M. (1997). The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method. *Mutation Research,* Vol. 392, pp. 11-18.

(48) Payne, C.M. *et al*. (2010). Hydrophobic bile acid-induced micronuclei formation, mitotic perturbations, and decreases in spindle checkpoint proteins: relevance to genomic instability in colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, Vol. 62/6, pp. 825-840.

(49) Bazin, E. *et al*. (2010). Genotoxicity of a Freshwater Cyanotoxin,Cylindrospermopsin, in Two Human Cell Lines: Caco-2 and HepaRG. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 51/3, pp. 251-259.

(50) Le Hegarat, L. *et al*. (2010). Assessment of the genotoxic potential of indirect chemical mutagens in HepaRG cellsby the comet and the cytokinesis-block micronucleus assays. *Mutagenesis*, Vol. 25/6, pp. 555-560.

(51) Josse, R. *et al*. (2012). An adaptation of the human HepaRG cells to the *in vitro* micronucleus assay. *Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 295-304.

(52) Ehrlich, V. *et al*. (2002). Fumonisin $B_1$ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis,* Vol. 17/3, pp. 257-260.

(53) Knasmüller, S. *et al*. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology,* Vol. 198/1-3, pp. 315-328.

(54) Gibson, D.P. *et al*. (1997). Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals. *Mutation Research,* Vol. 392/1-2, pp. 61-70.

(55) Bonassi, S. *et al*. (2001). HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 37/1, pp. 31-45.

(56) Maron, D.M., B.N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research,* Vol. 113/3-4, pp. 173-215.

(57) Ong, T.-m. *et al*. (1980). Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology,* Vol. 4/1, pp. 55-65.

▼M7

(58) Elliott, B.M. *et al*. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis,* Vol. 7, pp. 175-177.

(59) Matsushima, T. *et al*. (1976). «A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems», in *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres, F.J. *et al*. (eds), Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

(60) Johnson, T.E., D. R. Umbenhauer, S.M. Galloway (1996). Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9. *Environmental and Molecular Mutagenesis,* Vol. 28, pp. 51-59.

(61) PNUMA (2001). Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Disponible en: http://www.pops.int/

(62) Tucker, J.D., M.L. Christensen (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research*, Vol.190/3, pp. 225-8.

(63) Krahn, D.F., F.C. Barsky, K.T. McCooey (1982). «CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids», in Genotoxic Effects of Airborne Agents. Tice, R.R., D.L. Costa, K.M. Schaich (eds.), Plenum, New York, pp. 91-103.

(64) Zamora, P.O. *et al*. (1983). Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay. *Environmental Mutagenesis*, Vol. 5/6, pp. 795-801.

(65) Asakura, M. *et al*. (2008). An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Research*, Vol. 652/2, pp. 122-130.

(66) Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research,* Vol. 285/1, pp. 35-44.

(67) Phelps, J.B., M.L. Garriott, W.P. Hoffman (2002). A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. *Mutation Research,* Vol. 521/1-2, pp. 103-112.

(68) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2004). Corrigendum to «Report from the *in vitro* micronucleus assay working group». *Mutation Research,* 564, 97-100.

(69) Lorge, E. *et al*. (2008). Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects. *Mutation Research,* Vol. 655/1-2, pp. 1-3.

(70) Surralles, J. *et al*. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 341/3, pp. 169-184.

(71) Honma, M. (2011). Cytotoxicity measurement in *in vitro* chromosome aberration test and micronucleus test. *Mutation Research*, Vol. 724, pp. 86-87.

(72) Pfuhler, S. *et al*. (2011). *In vitro* genotoxicity test approaches with better predictivity: Summary of an IWGT workshop. *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 101-107.

(73) OCDE (2014). Document supporting the WNT decision to implement revised criteria for the selection of the top concentration in the *in vitro* mammalian cell assays on genotoxicity (Test Guidelines 473, 476 and 487). ENV/JM/TG(2014)17. Available upon request.

▼M7

(74) Morita T., M. Honma, K. Morikawa (2012). Effect of reducing the top concentration used in the *in vitro* chromosomal aberration test in CHL cells on the evaluation of industrial chemical genotoxicity. *Mutation Research*, Vol. 741, pp. 32-56.

(75) Brookmire L., J.J. Chen, D.D. Levy (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *in vitro* Chromosome Aberrations Assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 54/1, pp. 36-43.

(76) EPA, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention (2011). Chemical Substances of Unknown or Variable Composition, Complex Reaction Products and Biological Materials: UVCB Substances. http://www.epa.gov/opptintr/newchems/pubs/uvcb.txt.

(77) Sobol, Z. *et al*. (2012). Development and validation of an *in vitro* micronucleus assay platform in TK6 cells. *Mutation Research, Vol.*746/1, pp. 29-34.

(78) Hayashi, M., T. Sofuni, M. Jr. Ishidate (1983). An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 241-247.

(79) MacGregor, J. T., C.M. Wehr, R.G. Langlois (1983). A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y. *Mutation Research,* Vol. 120/4, pp. 269-275.

(80) Bryce, S.M. *et al*. (2011). Miniaturized flow cytometry-based CHO-K1 micronucleus assay discriminates aneugenic and clastogenic modes of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/4, pp. 280-286.

(81) Nicolette, J. *et al*. (2011). *in vitro* micronucleus screening of pharmaceutical candidates by flow cytometry in Chinese hamster V79 cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 52/5, pp. 355-362.

(82) Shi, J., R. Bezabhie, A. Szkudlinska (2010). Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. *Mutagenesis*, Vol. 25/1, pp. 33-40.

(83) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on testing and assessment, No.198, OECD Publishing, Paris.

(84) Fenech, M. *et al*. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research,* Vol. 534/1-2, pp. 65-75.

(85) Elhajouji, A., M. Cunha, M. Kirsch-Volders (1998). Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleate mononucleates in the cytokinesis-block assay. *Mutagenesis*, Vol. 13/2, pp. 193-8.

(86) Kirsch-Volders, M. *et al*. (2011). The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives of Toxicology,* Vol. 85/8, pp. 873-99.

(87) Hayashi, M. *et al*. (2010). Compilation and use of genetic toxicity historical control Data. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol.723/2, pp. 87-90.

(88) Ryan, T. P. (2000). *Statistical Methods for Quality Improvement*. 2nd ed., John Wiley and Sons, New York.

(89) Hoffman, W.P., M.L. Garriott, C. Lee (2003). «*In vitro* micronucleus test», in *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*, 2nd ed. Chow, S. (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, pp. 463-467.

(90) Fleiss, J. L., B. Levin, M.C. Paik (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, 3rd ed. John Wiley & Sons, New York.

(91) Galloway, S.M. *et al*. (1987). Chromosome aberration and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 10/suppl. 10, pp. 1-175.

▼**M7**

(92) Richardson, C. *et al*. (1989). Analysis of Data from *in vitro* Cytogenetic Assays. in *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*, Kirkland, D.J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141-154.

(93) International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use.

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Anéugeno**: Producto o proceso que, por interacción con los componentes del aparato del ciclo de división celular mitótica y meiótica, produce la aneuploidía de células u organismos.

**Aneuploidía**: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas que afecta a uno o varios cromosomas, pero no a dotaciones completas de cromosomas (poliploidía).

**Apoptosis**: Muerte celular programada, caracterizada por una serie de fases que llevan a la desintegración de las células para formar partículas limitadas por membranas que se eliminan a continuación por fagocitosis o por liberación.

**Proliferación celular**: Aumento del número de células como resultado de divisiones celulares mitóticas.

**Centrómero**: Región del ADN del cromosoma en la que se mantienen juntas las dos cromátidas y a la que se unen lateralmente los dos cinetocoros.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Concentraciones**: Se refiere a las concentraciones del producto problema en el medio de cultivo.

**Clastógeno**: Producto o fenómeno que provoca aberraciones cromosómicas estructurales en poblaciones de células u organismos eucarióticos.

**Citocinesis**: Proceso de división celular que sigue inmediatamente a la mitosis para formar dos células hijas, cada una de las cuales contiene un solo núcleo.

**Índice de proliferación con bloqueo citocinético (IPBC, o CBPI, por su nombre en inglés)**: Relación entre el número de células de segunda división en la población tratada respecto al de células del testigo sin tratar (véase la fórmula en el apéndice 2).

**Citostasis**: Inhibición del crecimiento celular (véase la fórmula en el apéndice 2).

**Citotoxicidad**: Para los ensayos que siguen este método de ensayo y se realizan en presencia de citocalasina B, la citotoxicidad se identifica como una reducción del índice de proliferación con bloqueo citocinético (IPBC) o del índice de replicación (IR) de las células tratadas en comparación con el testigo negativo (véanse el punto 26 y el apéndice 2).

Para los ensayos que siguen este método de ensayo y se realizan en ausencia de citocalasina B, la citotoxicidad se identifica como una reducción de la duplicación relativa de la población (DRP) o del aumento relativo del recuento de células (ARRC) de las células tratadas en comparación con el testigo negativo (véanse el punto 27 y el apéndice 2).

**Genotoxicidad**: Término general que engloba todos los tipos de lesión del ADN o de los cromosomas, con inclusión de roturas, deleciones, adiciones, modificaciones y uniones de nucleótidos, reorganizaciones, mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en lesiones cromosómicas estables.

**Células en interfase**: Células que no se encuentran en fase mitótica.

**Cinetocoro**: Estructura proteínica que se encuentra en el centrómero del cromosoma y a la cual se asocian las fibras del huso acromático durante la división celular para permitir el movimiento ordenado de los cromosomas hijos hacia los polos de las células hijas.

▼M7

**Micronúcleos**: Núcleos pequeños, adicionales a los núcleos celulares principales y separados de ellos, y producidos durante la telofase de la mitosis o de la meiosis por fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros retardados.

**Mitosis**: División del núcleo celular, generalmente compuesta por profase, prometafase, metafase, anafase y telofase.

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

**Mutágeno**: Agente que provoca un cambio hereditario en una o varias secuencias de pares de bases del ADN en los genes o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).

**No disyunción**: Caso en que las cromátidas emparejadas no se separan ni se segregan adecuadamente para repartirse entre las células hijas en formación, lo que provoca en estas la presencia de unos números anormales de cromosomas.

**Situación de la proteína p53**: La proteína p53 participa en la regulación del ciclo celular, en la apoptosis y en la reparación del ADN. Las células deficientes en proteína p53 funcional, incapaces de detener el ciclo celular o de eliminar las células dañadas por apoptosis u otros mecanismos (por ejemplo, inducción de la reparación del ADN) en relación con funciones de la proteína p53 en respuesta a las lesiones del ADN, deben estar, en teoría, más expuestas a las mutaciones génicas o a las aberraciones cromosómicas.

**Poliploidía**: Aberraciones cromosómicas numéricas en células u organismos que afectan a dotaciones completas de cromosomas, frente a las aberraciones que afectan solo a cromosomas sueltos (aneuploidía).

**Índice de proliferación (IP)**: Método de medición de la citotoxicidad sin utilización de la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

**Aumento relativo del recuento celular (ARRC, o RICC por su nombre en inglés)**: Método de medición de la citotoxicidad sin utilización de la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

**Duplicación relativa de la población (DRP)**: Método de medición de la citotoxicidad sin utilización de la citoB (véase la fórmula en el apéndice 2).

**Índice de replicación (IR)**: Relación entre el número de ciclos de división celular completados en un cultivo tratado y el del testigo sin tratar, durante el tiempo de exposición y la recuperación (véase la fórmula en el apéndice 2).

**Fracción hepática S9**: Sobrenadante de homogeneizado de hígado después de centrifugación a 9 000 g, es decir, extracto de hígado crudo.

**Mezcla S9**: Mezcla de la fracción hepática S9 y de cofactores necesarios para la actividad metabólica de las enzimas.

**Testigo del disolvente**: Término general para definir los cultivos testigo que reciben solo el disolvente utilizado para disolver el producto problema.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Testigos sin tratar**: Cultivos que no reciben tratamiento (es decir, ni producto problema ni disolvente), pero que se someten al mismo proceso en paralelo que los cultivos que reciben el producto problema.

▼M7

*Apéndice 2*

**FÓRMULAS PARA LA EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD**

***Cuando se utiliza citoB***, la evaluación de la citotoxicidad debe basarse en el **índice de proliferación con bloqueo citocinético (IPBC)** o en el **índice de replicación (IR)** (17) (69). El IPBC indica el número medio de núcleos por célula, y puede utilizarse para calcular la proliferación celular. El IR indica el número relativo de ciclos celulares por célula durante el período de exposición a la citoB en los cultivos tratados respecto al de los cultivos testigo y puede utilizarse para calcular el porcentaje de citostasis:

$$\% \text{ de citostasis} = 100 - 100\{(\text{IPBC}_T - 1) \div (\text{IPBC}_C - 1)\}$$

y:

T = cultivo tratado con el producto problema

C = cultivo testigo

donde:

$$\text{IPBC} = \frac{((\text{N.}^{\text{o}}\text{cél. mononucleadas}) + (2 \times \text{N.}^{\text{o}}\text{cél. binucleadas}) + (3 \times \text{N.}^{\text{o}}\text{cél. multinucleadas}))}{(\text{Número total de células})}$$

Así pues, un IPBC de 1 (todas las células son mononucleadas) es equivalente a un 100 % de citostasis.

Citostasis = 100 − IR

$$\text{IR} = \frac{((\text{N.}^{\text{o}}\text{cél. binucleadas}) + (2 \times \text{N.}^{\text{o}}\text{cél. multinucleadas}))/(\text{Número total de células})_T}{((\text{N.}^{\text{o}}\text{cél. binucleadas}) + (2 \times \text{N.}^{\text{o}}\text{cél. multinucleadas}))/(\text{Número total de células})_C} \times 100$$

T = cultivos tratados

C = cultivos testigo

Así pues, un IR del 53 % significa que, respecto al número de células que se han dividido para formar células binucleadas y multinucleadas en el cultivo testigo, solo el 53 % de este número se ha dividido en el cultivo tratado, es decir, hay un 47 % de citostasis.

***Cuando no se utiliza citoB***, se recomienda evaluar la citotoxicidad sobre la base del **aumento relativo del recuento celular (ARRC)** o de la **duplicación relativa de la población (DRP)** (69), ya que ambos parámetros tienen en cuenta la proporción de la población celular que se ha dividido.

$$\textbf{ARRC}(\%) = \frac{(\text{Aumento del número de células en los cultivos tratados(Final} - \text{inicio))}}{(\text{Aumento del número de células en los cultivos testigo(Final} - \text{inicio))}} \times 100$$

$$\textbf{DRP}(\%) = \frac{(\text{N.}^{\text{o}}\text{de duplicaciones de la población en los cultivos tratados})}{(\text{N.}^{\text{o}}\text{de duplicaciones de la población en los cultivos testigo})} \times 100$$

donde:

**N.º de duplicaciones de la población** = [log (número de células tras el tratamiento ÷ número de células al inicio)] ÷ log 2

Así pues, un ARRC o una DRP del 53 % indica un 47 % de citotoxicidad o citostasis.

▼**M7**

Si se utiliza el **índice de proliferación (IP)**, es posible evaluar la citotoxicidad mediante el recuento de los clones formados por una célula (cl1), dos células (cl2), de tres a cuatro células (cl4) y de cinco a ocho células (cl8):

$$IP = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

El IP se viene utilizando como parámetro válido y fiable de citotoxicidad también con líneas celulares cultivadas *in vitro* en ausencia de citoB (35) (36) (37) (38) y puede considerarse un parámetro adicional útil.

En cualquier caso, el número de células antes del tratamiento debe ser el mismo en el caso de los cultivos testigo tratados y negativos.

Si bien el recuento celular relativo (RCR, número de células en los cultivos tratados dividido por el número de células en los cultivos testigo) se había utilizado como parámetro de citotoxicidad en el pasado, ya no se recomienda porque puede subestimar la citotoxicidad.

Cuando se utilizan sistemas de examen automático, por ejemplo, la citometría de flujo, la citometría de barrido por láser o el análisis de imágenes, el número de células en la fórmula puede sustituirse por el número de núcleos.

En los cultivos de testigos negativos, la duplicación de la población o el índice de replicación deberán ser compatibles con el requisito de muestrear las células después del tratamiento durante un tiempo equivalente a unas 1,5-2,0 veces la duración del ciclo celular normal.

▼M3

## B.50. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: DA

### INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Se ha revisado el primer método de ensayo (ME) para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA, así como una revisión de los trabajos asociados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). En el LLNA, para medir la proliferación de linfocitos se utilizan timidina o yodo radioisotópicos, por lo que el ensayo tiene una utilidad limitada, dados los problemas que implica la adquisición, utilización y eliminación de sustancias radiactivas. El LLNA: DA (desarrollado por Daicel Chemical Industries, Ltd.) es una modificación no radiactiva del LLNA, en la que se cuantifica mediante bioluminiscencia el contenido de trifosfato de adenosina (ATP) como indicador de la proliferación de los linfocitos. El método de ensayo LLNA: DA ha sido validado y examinado, y recomendado por un grupo internacional de examen por pares, que lo ha considerado útil para identificar tanto sustancias que son sensibilizantes cutáneos como sustancias que no lo son, con ciertas limitaciones (10) (11) (12) (13). Este ME está diseñado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. En el capítulo B.6 del presente anexo y en la TG 406 de la OCDE se utilizan ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (14). Tanto el LLNA (capítulo B.42 del presente anexo, TG 429 de la OCDE) como sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: DA (capítulo B.50 del presente anexo, TG 442 A de la OCDE) y el LLNA: BrdU-ELISA (capítulo B.51 del presente anexo, TG 422 B de la OCDE), suponen una ventaja respecto a los ensayos con cobayas del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (14) en cuanto a la reducción y refinamiento del uso de animales.

2. El LLNA: DA, de forma similar al LLNA, estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Además, su capacidad de detectar sensibilizantes cutáneos sin necesidad de utilizar el marcado radiactivo del ADN suprime la posibilidad de que haya exposición ocupacional a la radiactividad y problemas de eliminación de residuos. Esto, a su vez, permitiría un mayor uso de los ratones para detectar sensibilizantes cutáneos, lo que podría reducir aún más la utilización de cobayas en ensayos que determinen el potencial de sensibilización cutánea (es decir, el capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (14).

### DEFINICIONES

3. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA: DA es un método LLNA modificado para identificar posibles sensibilizantes cutáneos, con limitaciones específicas. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA: DA en lugar del LLNA o de los ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6, TG 406 de la OCDE) (14) sino que, como su valor es equivalente, el LLNA: DA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior (10) (11). Antes de efectuar el estudio, el laboratorio de ensayo debe considerar toda la información disponible sobre la sustancia problema. Tal información ha

▼M3

de incluir la identidad y la estructura química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA: DA es apropiado para la sustancia problema [dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA: DA (véase el punto 5)] y para ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA: DA es un método *in vivo*, por lo que no elimina el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. Sin embargo, ofrece la posibilidad de reducir el uso de animales con este objetivo, respecto al nivel exigido por los ensayos con cobayas (capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (14). Además, el LLNA: DA supone un refinamiento sustancial (menos dolor y molestias) de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto, ya que, al contrario que los ensayos del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE, no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. A pesar de las ventajas que supone el LLNA: DA con respecto al capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (14), tiene ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar estos métodos (capítulo B.6 y TG 406 de la OCDE), como, por ejemplo, los ensayos de ciertos metales, los resultados falsos positivos que se producen con determinados irritantes cutáneos (como algunas sustancias de tipo tensioactivo) (6) (1 y capítulo B.42 del presente anexo) o la solubilidad de la sustancia problema. Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (16) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6 o la TG 406 de la OCDE) (14). Se ha recomendado que las limitaciones señaladas para el LLNA (1 y capítulo B.42 del presente anexo) se apliquen también al LLNA: DA (10). Además, puede que no sea apropiado recurrir al LLNA: DA para ensayar sustancias que afectan a los niveles de ATP (por ejemplo, sustancias que actúan como inhibidores del ATP) o en aquellos casos en que se vea afectada la medición exacta del contenido de ATP intracelular (por ejemplo, presencia de enzimas que degradan el ATP, presencia de ATP extracelular en el ganglio linfático). Dejando aparte estas limitaciones identificadas, el LLNA: DA debe ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que esta tenga propiedades asociadas que puedan interferir con la exactitud del LLNA: DA. Por otra parte, debe contemplarse la posibilidad de resultados positivos dudosos cuando se obtienen valores del índice de estimulación (IE) entre 1,8 y 2,5 (véanse los puntos 31 y 32). Esto se justifica por la base de datos de validación de 44 sustancias utilizando un IE ≥ 1,8 (véase el punto 6) de las que el LLNA: DA identificó correctamente la totalidad de los 32 sensibilizantes del LLNA, pero identificó incorrectamente tres de los doce productos no sensibilizantes con valores del IE entre 1,8 y 2,5 (es decir, positivos dudosos) (10). Sin embargo, como se ha utilizado el mismo conjunto de datos para establecer los valores del IE y para calcular las propiedades de predicción del ensayo, los resultados indicados pueden suponer una sobreestimación de las propiedades de predicción reales.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

6. El principio básico del LLNA: DA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia problema. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser ≥ 1,8 para que se pueda justificar el seguir

▼M3

con la evaluación de la sustancia problema como posible sensibilizante cutáneo. Los procedimientos descritos aquí se basan en el uso del contenido de ATP, medido por bioluminiscencia y del que se sabe que se corresponde con el número de células vivas (17), para indicar un aumento del número de células en proliferación en los ganglios linfáticos auriculares (18) (19). El método de bioluminiscencia utiliza la enzima luciferasa para catalizar la formación de luz a partir de ATP y luciferina de acuerdo con la siguiente reacción:

$$ATP + Luciferina + O_2 \xrightarrow{Luciferase} Oxiluciferina + AMP + PP_i + CO_2 + Luz$$

La intensidad de la luz emitida está relacionada linealmente con la concentración de ATP y se mide con un luminómetro. El ensayo con luciferina-luciferasa es un método sensible para cuantificar el ATP, utilizado en una amplia variedad de aplicaciones (20).

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

**Selección de la especie animal**

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Los estudios de validación del LLNA: DA se han efectuado exclusivamente con la cepa CBA/J, por lo que se considera que esta es la cepa preferida (12) (13). Se utilizan hembras jóvenes adultas, nulíparas y no preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que en la respuesta del LLNA: DA no existen diferencias significativas relacionadas con la cepa o el sexo.

**Alojamiento y alimentación**

8. Los ratones deben alojarse en grupos (21), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

**Preparación de los animales**

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

**Preparación de las soluciones administradas**

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

▼M3

**Verificación de la fiabilidad**

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las autoridades competentes antes de efectuar el LLNA: DA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar una respuesta positiva en el LLNA: DA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del IE $\geq$ 1,8 con respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del control positivo debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un IE > 10 se consideraría excesivo). Los CP preferidos son aldehído hexilcinámico (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 101-86-0) y eugenol (nº CAS 97-53-0), ambos al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos $\leq$ 6 meses) del control positivo en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA: DA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de CP históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA: DA mediante la obtención constante de resultados positivos con los CP en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA: DA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados sobre los controles positivos.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin control positivo en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con control positivo. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con control positivo periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con las sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con control positivo periódico aceptable y el estudio con control positivo periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un control positivo en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de control positivo en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (22).

▼M3

15. Aunque el producto utilizado como CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (23). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

16. En los casos en que se evalúen sustancias de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser útil también emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA: DA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

**Número de animales y niveles de dosis**

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y del vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (2) y (24). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (24) (25). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (6), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

▼M3

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de la sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 33). Además, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP solamente cuando se toman datos de los distintos animales (22). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. La recogida periódica de datos de cada animal aporta una ventaja en cuanto al bienestar de los animales al evitar la duplicación de ensayos, que podrían ser necesarios si los resultados sobre la sustancia problema recogidos inicialmente de una manera (por ejemplo, por datos de conjuntos de animales) tuvieran que ser considerados posteriormente por las autoridades normativas con otros requisitos (por ejemplo, de datos de cada animal).

**Ensayo de cribado previo**

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA: DA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA: DA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA: DA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 8). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (25). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), el día 7 (24 horas antes del final) y el día 8. Además, el día 8 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación local viene indicada por una puntuación de eritema $\geq 3$ o por un aumento del espesor de la oreja $\geq$ 25 % cualquiera de los días de medición (26) (27). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA: DA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18), induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

*Cuadro 1*

**Puntuación del eritema**

| Observación | Puntuación |
|---|---|
| Sin eritema | 0 |
| Eritema muy leve (apenas perceptible) | 1 |
| Eritema bien definido | 2 |

▼M3

| Observación | Puntuación |
|---|---|
| Eritema de moderado a intenso | 3 |
| Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema | 4 |

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (26) (27), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 % que sean estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (30) (31) (32) (33) (34).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (35) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA: DA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 8, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos de dolor o de sufrimiento intenso deben sacrificarse de forma compasiva (36).

**Calendario experimental del estudio principal**

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. Se aplica al dorso de cada oreja una solución acuosa de laurilsulfato de sodio (LSS) al 1 %, utilizando un pincel impregnado con la solución de LSS de modo que con cuatro o cinco pinceladas se cubra todo el dorso de cada oreja. Una hora tras la aplicación del LSS, se aplican en el dorso de cada oreja 25 µL de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2, 3 y 7:* Se repite el procedimiento de aplicación efectuado el día 1, con aplicación previa de la solución acuosa de LSS al 1 %, seguida de la aplicación de la sustancia problema.

— *Días 4, 5 y 6:* Sin tratamiento.

— *Día 8:* Se toma nota del peso de cada animal, así como de las eventuales observaciones clínicas. Unas 24 o 30 horas tras el inicio de la aplicación del día 7, se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se ponen en solución amortiguadora de fosfato (PBS), separando los de cada animal. En la referencia (22) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

▼M3

**Preparación de las suspensiones celulares**

26. De cada ratón se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos extirpados bilateralmente colocando los ganglios linfáticos entre dos portaobjetos de vidrio y aplicando una presión ligera, para aplastarlos. Tras confirmar que el tejido se ha extendido finamente, se separan los dos portaobjetos. Se suspende en LSS el tejido presente en ambos portaobjetos, poniéndolos en ángulo sobre una placa Petri y lavando con PBS, separando a la vez el tejido del portaobjetos con un raspador celular. Por otra parte, como los ganglios linfáticos de los animales del CN son pequeños, es importante extremar el cuidado para evitar la aparición de efectos artificiales en los valores del IE. Para el lavado de ambos portaobjetos debe utilizarse un volumen total de 1 mL de PBS. La suspensión de células de los ganglios linfáticos en la placa Petri debe homogeneizarse ligeramente con el raspador celular. Se toma a continuación con una micropipeta una alícuota de 20 μL de esta suspensión, procurando no incluir la membrana, visible a simple vista, y se mezcla después con 1,98 mL de PBS para obtener una muestra de 2 mL. Después se prepara otra muestra de 2 mL siguiendo el mismo procedimiento, de forma que de cada animal se obtienen dos muestras.

**Determinación de la proliferación celular (medición del contenido de ATP de los linfocitos)**

27. Los aumentos del contenido de ATP en los ganglios linfáticos se miden con el método de la luciferina/luciferasa, utilizando un juego de medición de ATP, que mide la bioluminiscencia en unidades relativas de luminiscencia (URL). El tiempo transcurrido entre el momento del sacrificio de los animales y la medición del contenido de ATP de cada animal deber ser uniforme, y no sobrepasar aproximadamente los 30 minutos, porque se considera que el contenido de ATP va disminuyendo gradualmente según transcurre el tiempo a partir del sacrificio de los animales (12). Así pues, la serie de operaciones desde la extracción de los ganglios linfáticos auriculares hasta la medición del ATP debe efectuarse en el plazo de 20 minutos, siguiendo una pauta temporal preestablecida, que será la misma con todos los animales. Se debe medir la luminiscencia del ATP en cada muestra de 2 mL, de forma que de cada animal se efectúan dos mediciones del ATP. A continuación se determina la luminiscencia media del ATP, que es el valor utilizado para los cálculos posteriores (véase el punto 30).

OBSERVACIONES

**Observaciones clínicas**

28. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (36).

**Pesos corporales**

29. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

30. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE medio. El IE se obtiene dividiendo la media de los valores de URL de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores de URL de los ratones del grupo de control del vehículo (CV) o disolvente. El IE medio del CV es entonces la unidad.

▼M3

31. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es ≥ 1,8 (10). Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos de disolvente o vehículo y CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso (es decir, con un valor del IE entre 1,8 y 2,5) se declara positivo (2) (3) (37).

32. En caso de una respuesta positiva dudosa, con un IE entre 1,8 y 2,5, es posible que los usuarios deseen considerar información adicional, tal como la relación dosis-respuesta, las pruebas de toxicidad sistémica o de irritación excesiva, y, en su caso, la significación estadística, junto con los valores del IE para confirmar si tales resultados son positivos (10). Deben tenerse también en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (4).

33. La recogida de datos de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos para la presencia y grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos paralelos de control de disolvente o vehículo). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados «valores atípicos»).

DATOS E INFORME

**Datos**

34. Los datos deben resumirse en forma de cuadro, con indicación de los valores de URL de cada animal, la media de los valores de URL de los animales del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo paralelo de control del disolvente o vehículo.

**Informe del ensayo**

35. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote],

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

▼**M3**

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— origen del juego de medición del ATP, su número de lote y los datos del control o garantía de calidad de su fabricante,

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN (disolvente o vehículo) en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— momento del sacrificio del animal y momento de la medición del ATP de cada animal,

— un cuadro con los valores de URL y del IE de cada ratón, dentro de cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores de URL/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento,

▼**M3**

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos de la sustancia problema como en los de control,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no un sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (*2010*), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-333.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No. 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm]

▼M3

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf].

(12) Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1-10.

(13) Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11-26.

(14) OCDE (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(15) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896-1904.

(16) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90-96.

(17) Crouch, S.P., Kozlowski, R., Slater, K.J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81-88.

(18) Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127-132.

(19) Dexter, S.J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K.M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27-34.

(20) Lundin A. (2000), Use of firefly ►C1 luciferasa ◄ in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346-370.

(21) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(22) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(23) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71-89.

(24) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13-31.

(25) OCDE (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

(26) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

(27) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.

(29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.

(30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.

(31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.

(32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.

(33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.

(34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.

(35) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm]

(36) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563-79.

(38) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO (2005)14, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

*Exactitud:* Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (38).

*Sustancia de evaluación comparativa:* Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características fisicoquímicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

*Falso negativo:* ►**C1** Sustancia problema identificada incorrectamente ◄ como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa.

►**C1** *Falso positivo:* Sustancia problema identificada incorrectamente ◄ como positiva o activa por un ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva.

*Peligro:* Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición.

*Reproducibilidad interlaboratorios:* Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias problema, pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (38).

*Reproducibilidad intralaboratorios:* Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (38).

*Valor atípico:* Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

*Garantía de calidad:* Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro por parte de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

*Fiabilidad:* Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (38).

*Sensibilización cutánea:* Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

*Índice de estimulación (IE):* Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

*Sustancia problema (o producto químico problema):* Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

▼M3

B.51. **SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA: ENSAYO CON GANGLIOS LINFÁTICOS LOCALES: BrdU-ELISA**

INTRODUCCIÓN

1. Las directrices de ensayo de productos químicos de la OCDE (TG, por su nombre en inglés) y los métodos de ensayo de la UE se revisan periódicamente en función de los avances científicos, los cambios en las necesidades normativas y las consideraciones de bienestar de los animales. Se ha revisado el primer método de ensayo (ME) para la determinación de la sensibilización cutánea con ratones, la prueba con ganglios linfáticos locales (LLNA, de su nombre en inglés, que corresponde a la TG 429 de la OCDE, capítulo B.42 del presente anexo) (1). Se han publicado los datos de la validación del LLNA y una revisión de los trabajos relacionados (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). En el LLNA, para medir la proliferación de linfocitos se utilizan timidina o yodo radioisotópicos, por lo que el ensayo tiene una utilidad limitada, dados los problemas que implica la adquisición, utilización y eliminación de sustancias radiactivas. El LLNA: BrdU-ELISA (ensayo de inmunoabsorción enzimática) es una modificación no radiactiva del LLNA que utiliza 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) sin marcado radiactivo (nº del Chemical Abstracts Service [CAS] 59-14-3) en un sistema de ensayo basado en el ELISA, para medir la proliferación de los linfocitos. El método de ensayo LLNA: BrdU-ELISA ha sido validado y examinado, y recomendado por un grupo internacional de científicos independientes de examen por pares, que lo ha considerado útil para identificar tanto sustancias que son sensibilizantes cutáneos como sustancias que no lo son, con ciertas limitaciones (10) (11) (12). Este ME está diseñado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de los productos químicos (sustancias y mezclas) en animales. En el capítulo B.6 del presente anexo y en la TG 406 de la OCDE se utilizan ensayos con cobayas, en concreto el ensayo de maximización en cobaya y el ensayo de Buehler (13). Tanto el LLNA (capítulo B.42 del presente anexo, TG 429 de la OCDE) como sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: BrdU-ELISA (capítulo B.51 del presente anexo, TG 422B de la OCDE) y el LLNA: DA (capítulo B.50 del presente anexo, TG 442A de la OCDE), suponen una ventaja respecto a los ensayos con cobayas del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (13) en cuanto a la reducción y refinamiento del uso de animales.

2. El LLNA: BrdU-ELISA, de forma similar al LLNA, estudia la fase de inducción de la sensibilización cutánea y proporciona datos cuantitativos adecuados para la evaluación de la relación dosis-respuesta. Además, su capacidad de detectar sensibilizantes cutáneos sin la necesidad de utilizar el marcado radiactivo del ADN suprime la posibilidad de que haya exposición ocupacional a la radiactividad y problemas de eliminación de residuos. Esto, a su vez, permitiría un mayor uso de los ratones para detectar sensibilizantes cutáneos, lo que podría reducir aún más la utilización de cobayas en ensayos que determinen el potencial de sensibilización cutánea (es decir, el capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (13).

DEFINICIONES

3. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. El LLNA: BrdU-ELISA es un método LLNA modificado para identificar posibles sensibilizantes cutáneos, con limitaciones específicas. Esto no implica necesariamente que deba utilizarse en todos los casos el LLNA: BrdU-ELISA en lugar del LLNA o de los ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6, TG 406 de la OCDE) (13) sino que, como su valor es equivalente, el LLNA: BrdU-ELISA puede emplearse como alternativa en la que, generalmente, los resultados positivos y negativos ya no necesitan una confirmación posterior (10) (11). Antes de efectuar el estudio, el laboratorio de ensayo debe considerar toda la información disponible sobre la sustancia

▼M3

problema. Tal información ha de incluir la identidad y la estructura química de esta sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuado con ella, y los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente. Es necesario sopesar esta información a fin de determinar si el LLNA: BrdU-ELISA es apropiado para la sustancia problema [dada la incompatibilidad de ciertos tipos de productos químicos con el LLNA: BrdU-ELISA (véase el punto 5)] y para ayudar en la selección de las dosis.

5. El LLNA: BrdU-ELISA es un método *in vivo*, por lo que no eliminará el uso de animales para la evaluación de la sensibilización alérgica por contacto. Sin embargo, ofrece la posibilidad de reducir el uso de animales con este objetivo, respecto al nivel exigido por los ensayos con cobayas (capítulo B.6; TG 406 de la OCDE) (13). Además, el LLNA: BrdU-ELISA supone un refinamiento sustancial de la forma de utilizar animales en los ensayos de sensibilización alérgica por contacto, ya que, al contrario que los ensayos del capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE, no necesita que se provoquen reacciones cutáneas de hipersensibilidad. Tampoco exige el uso de coadyuvantes, como ocurre en el ensayo de maximización con cobayas (capítulo B.6 del presente anexo, 13). Por consiguiente, el LLNA: BrdU-ELISA reduce las molestias para los animales. A pesar de las ventajas que supone el LLNA: BrdU-ELISA con respecto al capítulo B.6 y la TG 406 de la OCDE (13), tiene ciertas limitaciones que pueden obligar a utilizar estos métodos (capítulo B.6 y TG 406 de la OCDE), como, por ejemplo, los ensayos de ciertos metales, los resultados falsos positivos que se producen con determinados irritantes cutáneos (como algunas sustancias de tipo tensioactivo) (6) (1 y capítulo B.42 del presente anexo) o la solubilidad de la sustancia problema. Además, las sustancias o clases químicas que contienen grupos funcionales de los que se haya visto que actúan como posibles factores de confusión (15) pueden hacer necesario el uso de ensayos con cobayas (es decir, el ME B.6 o la TG 406 de la OCDE) (13). Se ha recomendado que las limitaciones señaladas para el LLNA (1 y capítulo B.42 del presente anexo) se apliquen también al LLNA: BrdU-ELISA (10). Dejando aparte estas limitaciones detectadas, el LLNA: BrdU-ELISA debería ser aplicable para el ensayo de cualquier sustancia, salvo que haya propiedades asociadas a esta que puedan interferir con la exactitud del LLNA: BrdU-ELISA. Por otra parte, debe contemplarse la posibilidad de resultados positivos dudosos cuando se obtienen valores del índice de estimulación (IE) entre 1,6 y 1,9 (véanse los puntos 31 y 32). Esto se justifica por la base de datos de validación de 43 sustancias utilizando un IE ≥ 1,6 (véase el punto 6) de las que el LLNA: BrdU-ELISA identificó correctamente la totalidad de los 32 sensibilizantes del LLNA, pero identificó incorrectamente dos de los once productos no sensibilizantes con valores de IE entre 1,6 y 1,9 (es decir, positivos dudosos) (10). Sin embargo, como se ha utilizado el mismo conjunto de datos para establecer los valores del IE y para calcular las propiedades de predicción del ensayo, los resultados indicados pueden suponer una sobreestimación de las propiedades de predicción reales.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

6. El principio básico del LLNA: BrdU-ELISA es el de que los sensibilizantes inducen una proliferación de linfocitos en los ganglios linfáticos que drenan la zona de aplicación de la sustancia química. Esta proliferación es proporcional a la dosis y a la potencia del alérgeno aplicado y proporciona un método sencillo para obtener una medida cuantitativa de la sensibilización. La proliferación se mide comparando la proliferación media de cada grupo de ensayo con la proliferación media del grupo de control tratado con el vehículo (CV). Se determina la relación entre la proliferación media observada en cada grupo tratado y la del grupo de CV paralelo, denominada índice de estimulación (IE), y que debe ser ≥ 1,6 para que se pueda justificar el seguir con la evaluación de la sustancia problema como posible

▼M3

sensibilizante cutáneo. Los procedimientos aquí descritos se basan en medir el contenido de BrdU y utilizarlo para indicar el aumento del número de células en proliferación presentes en los ganglios linfáticos auriculares que drenan la zona. El BrdU es un análogo de la timidina y se incorpora de forma similar en el ADN de las células en proliferación. La incorporación del BrdU se mide mediante ELISA, que utiliza un anticuerpo específico del BrdU, marcado también con peroxidasa. Cuando se añade el sustrato, la peroxidasa reacciona con este y se obtiene un producto coloreado, que se cuantifica a una absorbancia específica con un lector de placas de microtitulación.

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

**Selección de la especie animal**

7. El ratón es la especie elegida para este ensayo. Los estudios de validación del LLNA: BrdU-ELISA se han efectuado exclusivamente con la cepa CBA/J, por lo que se considera que esta es la cepa preferida (10) (12). Se utilizan hembras jóvenes adultas, nulíparas y no preñadas. Al comienzo del estudio los animales deben tener una edad de 8 a 12 semanas; la variación del peso de los animales debe ser mínima, sin superar el 20 % del peso medio. También se podrán utilizar otras cepas y machos, si se aportan datos suficientes para demostrar que en la respuesta del LLNA: BrdU-ELISA no existen diferencias significativas relacionadas con la cepa o el sexo.

**Alojamiento y alimentación**

8. Los ratones deben alojarse en grupos (16), salvo que se aporten pruebas científicas adecuadas que avalen su alojamiento individual. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber.

**Preparación de los animales**

9. Se eligen los animales al azar, se marcan para su identificación individual (pero no en las orejas) y se mantienen en sus jaulas al menos cinco días hasta el inicio de la administración de la sustancia, para que se aclimaten a las condiciones del laboratorio. Antes de iniciar el tratamiento, todos los animales serán examinados para comprobar que no presentan lesiones cutáneas observables.

**Preparación de las soluciones administradas**

10. Las sustancias sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos y diluirse, cuando proceda, antes de aplicarse a la oreja del ratón. Las sustancias líquidas pueden aplicarse puras o diluidas antes de su administración. Las sustancias insolubles, como las que se ven generalmente en los productos sanitarios, deben someterse a extracción forzada en un disolvente apropiado con el fin de recoger todos los componentes extraíbles para el ensayo antes de efectuar la aplicación a la oreja del ratón. Las soluciones problema deben prepararse cada día, salvo que mediante datos de estabilidad se demuestre que es posible conservarlas.

**Verificación de la fiabilidad**

11. Se utilizan sustancias de control positivo (CP) para demostrar que el ensayo funciona apropiadamente, respondiendo con la sensibilidad adecuada y reproducible cuando se aplica una sustancia problema sensibilizante de la que se ha caracterizado bien la magnitud de la respuesta. Se recomienda la inclusión de un CP en paralelo porque demuestra la competencia del laboratorio para efectuar con éxito cada ensayo y permite la evaluación de la reproducibilidad y comparabilidad intra e interlaboratorios. Por otra parte, ciertas autoridades normativas requieren la utilización de un CP en cada

▼M3

estudio, por lo que se aconseja a los usuarios que consulten con las autoridades competentes antes de efectuar el LLNA: BrdU-ELISA. En consecuencia, se recomienda el uso sistemático de un CP en paralelo para evitar la necesidad, que podría surgir del uso de un CP periódico, de tener que efectuar ensayos adicionales con animales para cumplir los requisitos (véase el punto 12). El CP debe dar respuesta positiva en el LLNA: BrdU-ELISA con un nivel de exposición calculado para producir un aumento del IE $\geq$ 1,6 con respecto al grupo de control negativo (CN). La dosis del CP debe ser tal que no provoque un exceso de irritación cutánea ni toxicidad sistémica, y que la inducción sea reproducible pero no excesiva (por ejemplo, un IE > 14 se consideraría excesivo). Los CP preferidos son aldehído hexilcinámico (nº CAS 101-86-0) y eugenol (nº CAS 97-53-0), ambos al 25 % en acetona: aceite de oliva (4:1, v/v). Puede haber circunstancias en que sea posible utilizar otros controles positivos, mediante una justificación adecuada y siempre que se cumplan los criterios antes mencionados.

12. Aunque se recomienda la inclusión de un grupo de CP en paralelo, puede haber situaciones en que sea adecuado hacer ensayos periódicos (es decir, a intervalos $\leq$ 6 meses) del CP en caso de laboratorios que efectúan regularmente el LLNA: BrdU-ELISA (es decir, lo efectúan con una frecuencia no inferior a una vez al mes) y tienen una base de datos de CP históricos que demuestra la capacidad del laboratorio para obtener resultados reproducibles y exactos con dichos controles. El laboratorio puede demostrar que tiene la competencia adecuada para realizar el LLNA: BrdU-ELISA mediante la obtención constante de resultados positivos con los CP en al menos diez ensayos independientes llevados a cabo en un plazo razonable (es decir, de menos de un año).

13. Debe incluirse un grupo de CP en paralelo siempre que haya un cambio de procedimiento del LLNA: BrdU-ELISA (por ejemplo, cambio del personal cualificado, cambio de los materiales o reactivos utilizados en el método de ensayo, cambio en el equipo analítico, cambio en el origen de los animales), y tales cambios deben documentarse en los informes del laboratorio. Debe prestarse atención al efecto de estos cambios sobre la idoneidad de la base de datos históricos previamente establecida cuando se deba decidir si es necesario establecer una nueva base de datos históricos para documentar la constancia de los resultados de los CP.

14. Los investigadores no deben olvidar que la decisión de realizar un estudio con controles positivos de forma periódica en lugar de en paralelo tiene consecuencias sobre la idoneidad y aceptabilidad de los resultados negativos obtenidos en ensayos efectuados sin control positivo en paralelo en el intervalo entre dos estudios periódicos con control positivo. Por ejemplo, si se obtiene un resultado falso negativo en un estudio con control positivo periódico, es posible dudar de los resultados negativos obtenidos con sustancias problema en el intervalo transcurrido entre el último estudio con control positivo periódico aceptable y el estudio con control positivo periódico inaceptable. Las consecuencias de estos resultados deben sopesarse cuidadosamente a la hora de decidir si se incluye un CP en paralelo o si solo se hace de forma periódica. Debe considerarse igualmente el uso de menos animales en el grupo de CP en paralelo cuando esté justificado científicamente y si el laboratorio demuestra, sobre la base de datos históricos propios del laboratorio, que es posible utilizar menos ratones (17).

15. Aunque el producto utilizado como CP debe someterse al ensayo en un vehículo conocido por provocar una respuesta uniforme (por ejemplo, acetona: aceite de oliva; 4:1, v/v), puede haber ciertas situaciones legales en las que también sea necesario utilizar un vehículo no estándar (formulación relevante desde el punto de vista clínico o químico) (18). Si para el CP en paralelo se utiliza un vehículo diferente del de la sustancia problema, debe incluirse un CV aparte para el CP en paralelo.

▼M3

16. En los casos en que se evalúen sustancias problema de una clase química o gama de respuestas específica, puede ser útil también emplear sustancias de evaluación comparativa para demostrar que el método de ensayo funciona adecuadamente en cuanto a la detección del potencial de sensibilización cutánea de estos tipos de sustancias problema. Para ser adecuadas, las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades:

— similitud estructural y funcional con la clase de la sustancia problema que se está evaluando,

— características físicas y químicas conocidas,

— datos de apoyo procedentes del LLNA: BrdU-ELISA,

— datos de apoyo procedentes de otros modelos animales o de seres humanos.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

**Número de animales y niveles de dosis**

17. Se utilizará un mínimo de cuatro animales por grupo de dosis, con un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, más un grupo de control negativo (CN) en paralelo tratado solo con el vehículo utilizado para la sustancia problema y un control positivo (CP) (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15). Debe estudiarse la posibilidad de utilizar varias dosis del CP, sobre todo cuando este se someta a ensayo de forma intermitente. Excepto por la ausencia de tratamiento con la sustancia problema, los animales de los grupos de control deben ser manejados y tratados de manera idéntica a la utilizada con los animales de los grupos tratados.

18. La elección de las dosis y el vehículo debe basarse en las recomendaciones que se recogen en las referencias (2) y (19). Normalmente se eligen dosis consecutivas a partir de una serie adecuada de concentraciones, como 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 %, etc. La elección de la serie de concentraciones utilizada debe justificarse científicamente. Para seleccionar las tres concentraciones consecutivas, ha de tenerse en cuenta toda la información toxicológica (por ejemplo, sobre toxicidad aguda e irritación cutánea) y la información estructural y fisicoquímica existente de que se pueda disponer respecto a la sustancia problema (o sustancias relacionadas estructuralmente con ella), de forma que la concentración más alta logre la máxima exposición evitando a la vez la toxicidad sistémica y la excesiva irritación cutánea local (19) (20 y capítulo B.4 del presente anexo). A falta de tal información, puede ser necesario realizar un ensayo inicial de cribado previo (véanse los puntos 21 a 24).

19. El vehículo no debe interferir con el resultado del ensayo ni sesgarlo, y debe seleccionarse con el propósito de maximizar la solubilidad para conseguir la mayor concentración posible y de obtener a la vez una solución o suspensión que sea adecuada para la aplicación de la sustancia problema. Los vehículos recomendados son acetona: aceite de oliva (4:1, v/v), *N,N*-dimetilformamida, metil-etil-cetona, propilenglicol y dimetilsulfóxido (6), pero se pueden utilizar otros si se aporta una justificación científica suficiente. En determinadas situaciones, puede ser necesario utilizar un disolvente relevante desde el punto de vista clínico o la formulación comercial en que se vende la sustancia analizada, como control adicional. Se tendrá especial cuidado en velar por que las sustancias problema hidrófilas se incorporen a un sistema de vehículo que humedezca la piel y no se escurra inmediatamente, mediante la incorporación de los solubilizadores adecuados (por ejemplo, Pluronic® L92 al 1 %). Por tanto, se evitarán los vehículos totalmente acuosos.

▼M3

20. El estudio de los ganglios linfáticos de cada uno de los ratones permite evaluar la variabilidad interanimales y comparar estadísticamente la diferencia entre las mediciones efectuadas en el grupo de sustancia problema y las efectuadas en el grupo de CV (véase el punto 33). Además, se puede evaluar la posibilidad de reducir el número de ratones del grupo de CP solamente cuando se toman datos de los distintos animales (17). Por otra parte, ciertas autoridades normativas exigen la recogida de datos de cada animal. La recogida periódica de datos de cada animal aporta una ventaja en cuanto al bienestar animal al evitar la duplicación de ensayos, que podrían ser necesarios si los resultados sobre la sustancia problema recogidos inicialmente de una manera (por ejemplo, por datos de conjuntos de animales) tuvieran que ser considerados posteriormente por las autoridades normativas con otros requisitos (por ejemplo, de datos de cada animal).

**Ensayo de cribado previo**

21. A falta de información para determinar la dosis máxima que se debe utilizar en el ensayo (véase el punto 18), hay que efectuar un ensayo de cribado previo a fin de definir el nivel adecuado de dosis para el LLNA: BrdU-ELISA. La finalidad del ensayo de cribado previo es orientar para la selección del nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal, en caso de que no se disponga de información sobre la concentración que induce toxicidad sistémica (véase el punto 24) o excesiva irritación cutánea local (véase el punto 23). El nivel máximo de dosis para este ensayo debe ser una concentración del 100 % de la sustancia problema en caso de líquidos, o la mayor concentración posible en caso de sólidos o suspensiones.

22. El ensayo de cribado previo se realiza bajo las mismas condiciones que el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal, con la diferencia de que no hay evaluación de la proliferación en los ganglios linfáticos y de que pueden utilizarse menos animales por grupo de dosis. Se sugiere emplear uno o dos animales por grupo de dosis. Todos los ratones deben observarse diariamente para detectar posibles signos de toxicidad sistémica o irritación local en el punto de aplicación. Los pesos corporales se registran al inicio del ensayo y antes de que termine (día 6). Se observan ambas orejas de cada ratón, para detectar eventuales eritemas, y se puntúan según el cuadro 1 (20, y capítulo B.4 del presente anexo). Se mide el espesor de la oreja con un calibrador de espesores (por ejemplo, de micrómetro digital o calibrador de espesores de escala circular de Peacock) el día 1 (antes de la administración), el día 3 (unas 48 horas tras la administración de la primera dosis), y el día 6. Además, el día 6 se puede medir el espesor de la oreja determinando el peso de un bocado de la misma, obtenido con un sacabocados después del sacrificio compasivo de los animales. La excesiva irritación local viene indicada por una puntuación de eritema $\geq 3$ o por un espesor de la oreja $\geq 25$ % cualquiera de los días de medición (21) (22). La dosis máxima seleccionada para el estudio LLNA: BrdU-ELISA principal será la dosis inmediatamente inferior a la que, dentro de la serie de concentraciones del ensayo de cribado previo (véase el punto 18) induce toxicidad sistémica o excesiva irritación cutánea local.

*Cuadro 1*

**Puntuación de eritema**

| Observación | Puntuación |
|---|---|
| Sin eritema | 0 |
| Eritema muy leve (apenas perceptible) | 1 |
| Eritema bien definido | 2 |

▼M3

| Observación | Puntuación |
|---|---|
| Eritema de moderado a intenso | 3 |
| Eritema intenso (rojo de remolacha) o formación de escaras que impide la clasificación del eritema | 4 |

23. Además de un aumento del 25 % del espesor de la oreja (21) (22), también se ha utilizado para señalar irritantes en el LLNA un aumento estadísticamente significativo del espesor de la oreja de los ratones tratados respecto a los ratones de control (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Sin embargo, aunque puede haber aumentos del espesor de la oreja inferiores al 25 %, estadísticamente significativos, estos no se han asociado específicamente con una irritación excesiva (25) (26) (27) (28) (29).

24. Las siguientes observaciones clínicas pueden indicar toxicidad sistémica (30) cuando forman parte de una evaluación integrada y, por tanto, pueden indicar el nivel máximo de dosis que debe utilizarse en el LLNA: BrdU-ELISA principal: cambios en la función del sistema nervioso (por ejemplo, piloerección, ataxia, temblores y convulsiones), cambios en el comportamiento (por ejemplo, agresividad, cambios en las actividades de limpieza, cambio marcado en el nivel de actividad), cambios en las pautas respiratorias (es decir, cambios en la frecuencia e intensidad de la respiración, tales como disnea, jadeos y estertores), y cambios en el consumo de agua y comida. También deben tenerse en cuenta en la evaluación los eventuales signos de letargo o ausencia de respuesta a estímulos, los signos clínicos de dolor o sufrimiento que no sean ligeros o momentáneos, y la reducción > 5 % del peso corporal desde el día 1 al día 6, así como la mortalidad. Los animales moribundos o que presenten signos de dolor o de sufrimiento intenso deben sacrificarse de forma compasiva (31).

**Calendario experimental del estudio principal**

25. El calendario experimental del ensayo es el siguiente:

— *Día 1:* Se identifica cada animal y se toma nota de su peso, así como de las eventuales observaciones clínicas. En el dorso de cada oreja se aplican 25 μL de la dilución apropiada de la sustancia problema, del vehículo solo o del control positivo (en paralelo o reciente, según la estrategia del laboratorio en relación con los puntos 11 a 15).

— *Días 2 y 3:* Se repite el procedimiento de aplicación del día 1.

— *Día 4:* Sin tratamiento.

— *Día 5:* Se inyectan por vía intraperitoneal 0,5 mL (5 mg/ratón) de una solución de BrdU (10 mg/mL).

— *Día 6:* Se toma nota del peso de cada animal, así como de las eventuales observaciones clínicas. A las 24 horas, aproximadamente, de la inyección de BrdU, se sacrifican los animales de forma compasiva. Se extirpan los ganglios linfáticos auriculares de cada oreja de los ratones y se sumergen en solución amortiguadora de fosfato (PBS), separando los de cada animal. En la referencia (17) se recogen los detalles y diagramas de la identificación y disección de los ganglios linfáticos. Para seguir mejor la respuesta cutánea local en el estudio principal, pueden incluirse en el protocolo del estudio parámetros adicionales, tales como la puntuación del eritema auricular o las medidas del espesor de la oreja (obtenidas con un calibrador de espesor, o determinando el peso de un bocado de la oreja, en la autopsia).

▼M3

**Preparación de las suspensiones celulares**

26. De cada ratón se prepara una suspensión de células sueltas de los ganglios linfáticos (CGL) extirpados bilateralmente, mediante disgregación mecánica suave a través de una malla de acero inoxidable de 200 μm de luz, u otra técnica aceptable que permita obtener una suspensión de células sueltas (por ejemplo, uso de un mortero de plástico desechable para aplastar los ganglios linfáticos, seguido del paso por una malla de nailon de 70 μm). El procedimiento de preparación de la suspensión de CGL es de importancia crítica en este ensayo y por tanto cada operario debe adquirir de forma anticipada habilidad para efectuarlo. Por otra parte, como los ganglios linfáticos de los animales del CN son pequeños, es importante extremar el cuidado para evitar la aparición de efectos artificiales en los valores del IE. En cada caso, el volumen final de la suspensión de CGL debe ajustarse a un volumen optimizado determinado (de unos 15 mL). El volumen optimizado se basa en lograr una absorbancia media del grupo de CN entre 0,1 y 0,2.

**Determinación de la proliferación celular (medición del contenido de BrdU en el ADN de los linfocitos)**

27. El contenido de BrdU se mide mediante ELISA utilizando un juego comercial (por ejemplo, el de Roche Applied Science, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11 647 229 001). En resumen, a los pocillos de una microplaca de fondo plano se añaden por triplicado 100 μL de la suspensión de CGL. Tras la fijación y desnaturalización de las CGL, se añade a cada pocillo anticuerpo anti-BrdU y se deja reaccionar. Después se elimina por lavado el anticuerpo anti-BrdU y, a continuación, se añade la solución de sustrato y se deja que se produzca el cromógeno. Entonces, se mide la absorbancia a 370 nm con una longitud de onda de referencia de 492 nm. En todos los casos, deben optimizarse las condiciones del ensayo (véase el punto 26).

OBSERVACIONES

**Observaciones clínicas**

28. Al menos una vez al día se realizará una observación minuciosa de cada animal en busca de signos clínicos, bien de irritación local en el punto de aplicación o bien de toxicidad sistémica. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Los planes de seguimiento deben incluir criterios para detectar rápidamente a los ratones que presenten toxicidad sistémica, excesiva irritación cutánea local o corrosión cutánea, a fin de someterlos a sacrificio compasivo (31).

**Pesos corporales**

29. Como se indica en el punto 25, hay que medir el peso corporal de cada animal al empezar el ensayo y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

30. Los resultados de cada grupo de tratamiento se expresan como IE medio. El IE se obtiene dividiendo la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los ratones dentro de cada grupo tratado con la sustancia problema, y la del grupo de control positivo (CP), por la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los ratones del grupo de control del disolvente o vehículo (CV). El IE medio del CV es entonces la unidad.

El índice de marcado con BrdU se define de la manera siguiente:

$$\text{Índice de marcado con BrdU} = (ABS_{le} - \text{ABS blanco}_{le}) - (ABS_{ref} - \text{ABS blanco}_{ref})$$

donde: le = longitud de onda de emisión; y ref = longitud de onda de referencia.

▼M3

31. En el proceso de toma de decisiones se considera que un resultado es positivo si el IE es ≥ 1,6 (10). Sin embargo, la fuerza de la relación dosis-respuesta, la significación estadística y la coherencia de las respuestas de los grupos del disolvente o vehículo y del CP pueden utilizarse también a la hora de determinar si un resultado dudoso (es decir, con un valor del IE entre 1,6 y 1,9) se declara positivo (3) (6) (32).

32. En caso de una respuesta positiva dudosa, con un IE entre 1,6 y 1,9, es posible que los usuarios deseen considerar información adicional, tal como la relación dosis-respuesta, las pruebas de toxicidad sistémica o de irritación excesiva, y, en su caso, la significación estadística, junto con los valores del IE para confirmar si tales resultados son positivos (10). Deben tenerse también en cuenta diversas propiedades de la sustancia problema, por ejemplo si está relacionada estructuralmente con sensibilizantes cutáneos conocidos, si produce excesiva irritación cutánea en el ratón, y la naturaleza de la relación dosis-respuesta observada. Estas y otras consideraciones se comentan con detalle en otro lugar (4).

33. La recogida de datos de cada ratón permite el análisis estadístico de los datos para la presencia y grado de la relación dosis-respuesta. Toda valoración estadística puede incluir una evaluación de la relación dosis-respuesta, así como comparaciones adecuadamente ajustadas de los grupos de ensayo (por ejemplo, comparaciones por parejas entre grupos tratados y grupos paralelos de control de disolvente o vehículo). Los análisis estadísticos pueden incluir, por ejemplo, la regresión lineal o la prueba de William para evaluar las tendencias de la relación dosis-respuesta, y la prueba de Dunnett para hacer comparaciones por parejas. Para elegir el método de análisis estadístico adecuado, el investigador debe conocer las posibles desigualdades de las varianzas y otros problemas asociados, que pueden exigir una transformación de los datos o el uso de un análisis estadístico no paramétrico. En cualquier caso, es posible que el investigador tenga que efectuar cálculos del IE y análisis estadísticos con y sin algunos puntos de datos (a veces llamados «valores atípicos»).

DATOS E INFORME

**Datos**

34. Los datos deben resumirse en forma de cuadro, con indicación de los valores del índice de marcado con BrdU de cada animal, la media de los valores del índice de marcado con BrdU de los animales del grupo, su término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM), y el IE medio de cada grupo tratado con la sustancia problema, comparado con el del grupo paralelo de control de disolvente o vehículo.

**Informe del ensayo**

35. El informe del ensayo contendrá la siguiente información:

Sustancias problema y de control:

— datos de identificación [por ejemplo, números CAS y CE (si se conocen), origen, pureza, impurezas conocidas, número de lote),

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, volatilidad, estabilidad, solubilidad),

— si se trata de una mezcla, composición y porcentajes relativos de sus componentes.

Disolvente o vehículo:

— datos de identificación [pureza, concentración (en su caso), volumen utilizado],

— justificación de la elección del vehículo.

▼M3

Animales de experimentación:

— procedencia de los ratones CBA,

— situación microbiológica de los animales, cuando se conozca,

— número y edad de los animales,

— procedencia de los animales, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

Condiciones del ensayo:

— origen del juego de ELISA, su número de lote y los datos del control o garantía de calidad de su fabricante (sensibilidad y especificidad del anticuerpo y límite de detección),

— detalles de la preparación y aplicación de la sustancia problema,

— justificación de las dosis elegidas (con los resultados del ensayo de cribado previo, si se ha efectuado),

— concentraciones empleadas del vehículo y de la sustancia problema, y cantidad total de sustancia problema aplicada,

— detalles de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo u origen de la dieta y el origen del agua),

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y toma de muestras,

— métodos de determinación de la toxicidad,

— criterios para considerar los estudios positivos o negativos,

— detalles sobre las eventuales desviaciones del protocolo y explicación sobre cómo afectan estas al diseño y a los resultados del estudio.

Verificación de la fiabilidad:

— resumen de los resultados de la última verificación de la fiabilidad realizada, con información sobre la sustancia problema, la concentración y el vehículo utilizados,

— datos de los CP en paralelo o históricos y de los CN (disolvente o vehículo) en paralelo del laboratorio que realiza el ensayo,

— si no se ha incluido un CP en paralelo, la fecha y el informe de laboratorio del CP periódico más reciente y un informe donde se especifiquen los datos de los CP históricos del laboratorio, para justificar la ausencia de un CP en paralelo.

Resultados:

— peso de cada ratón al inicio del tratamiento y en la fecha prevista para el sacrificio compasivo, así como la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de cada grupo tratado,

— cronología del inicio y signos de toxicidad, incluida la irritación cutánea en el punto de administración para cada animal, en su caso,

— un cuadro con los valores del índice de marcado con BrdU y del IE de cada ratón, dentro de cada grupo de tratamiento,

— la media y el término del error asociado (por ejemplo, DT, EEM) de los valores del índice de marcado con BrdU/ratón de cada grupo de tratamiento y los resultados del análisis de los valores atípicos de cada grupo de tratamiento,

▼M3

— el valor del IE calculado y una medida adecuada de la variabilidad que tenga en cuenta la variabilidad interanimales tanto en los grupos de la sustancia problema como en los de control,

— la relación dosis-respuesta,

— el análisis estadístico, en su caso.

Discusión de los resultados:

— un breve comentario sobre los resultados, el análisis de la relación dosis-respuesta y los análisis estadísticos, en su caso, con la conclusión de si la sustancia problema debe ser considerada o no sensibilizante cutáneo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999-1002.

(3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985-997.

(4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327-33.

(5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49-59.

(6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf]

(7) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258-273.

(8) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274-286.

(9) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249-257.

(10) ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No. 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm]

▼**M3**

(11) ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNA-PRPRept2009.pdf]

(12) Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129-134.

(13) OCDE (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No. 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896-1904.

(15) Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J.C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90-96.

(16) ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

(17) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección:[http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf]

(18) McGarry, H.F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71-89.

(19) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13-31.

(20) OCDE (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No. 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(21) Reeder, M.K., Broomhead, Y.L., DiDonato, L. and DeGeorge, G.L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

(22) ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

(23) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195-206.

(24) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83-94.

(25) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245-256.

▼**M3**

(26) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491-506.

(27) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60-68.

(28) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721-728.

(29) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023-1028.

(30) ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Disponible en la dirección: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

(31) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(32) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563-79.

(33) OCDE (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

▼**M3**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

*Exactitud:* Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (33).

*Sustancia de evaluación comparativa:* Sustancia sensibilizante o no sensibilizante utilizada como patrón de comparación con una sustancia problema. Las sustancias de evaluación comparativa deben presentar las siguientes propiedades: i) fuente de procedencia coherente y fiable, ii) similitud estructural y funcional con la clase de las sustancias problema, iii) características físicas y químicas conocidas, iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la gama de respuestas deseada.

*Falso negativo:* Sustancia problema identificada incorrectamente como negativa o inactiva por un método de ensayo, cuando en realidad es positiva o activa (33).

*Falso positivo:* Sustancia problema identificada incorrectamente como positiva o activa por un ensayo, cuando en realidad es negativa o inactiva (33).

*Peligro:* Posibilidad de que se dé un efecto adverso sobre la salud o el medio ambiente. El *efecto adverso se manifiesta solamente si hay un nivel suficiente de exposición.*

*Reproducibilidad interlaboratorios:* Medida del grado en que diferentes laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo la misma sustancia problema pueden proporcionar resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (33).

*Reproducibilidad intralaboratorios:* Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (33).

*Valor atípico:* Una observación que es muy diferente de los otros valores en una muestra aleatoria de una población.

*Garantía de calidad:* Proceso de gestión por el que personas independientes de las que efectúan el ensayo evalúan el cumplimiento de las normas, los requisitos y los procedimientos de registro por parte de los ensayos de laboratorio, así como la exactitud de los datos transferidos.

*Fiabilidad:* Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (33).

*Sensibilización cutánea:* Proceso inmunológico que se observa cuando un individuo predispuesto sufre una exposición tópica a una sustancia alergénica inductora, la cual provoca una respuesta inmunitaria cutánea que puede llevar a la aparición de sensibilización por contacto.

*Índice de estimulación (IE):* Valor calculado para evaluar el potencial de sensibilización cutánea de una sustancia problema y que es la relación entre la proliferación en los grupos tratados y la del grupo de control del vehículo en paralelo.

*Sustancia problema (o producto químico problema):* Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este ME.

▼M4

## B.52. TOXICIDAD AGUDA POR INHALACIÓN. MÉTODO DE LAS CLASES DE TOXICIDAD AGUDA

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 436 de la OCDE (2009). Las primeras TG 403 de toxicidad aguda por inhalación se adoptaron en 1981 y desde entonces han sido revisadas [véase el capítulo B.2 de este anexo (1)]. Se consideró apropiado desarrollar un método de clases de toxicidad aguda por inhalación [Acute Toxic Class o ATC, (2) (3) (4)] después de adoptar el método de las clases de toxicidad aguda por vía oral (capítulo B.1 *ter* de este anexo) (5). Una evaluación retrospectiva de los resultados del método de las clases de toxicidad aguda por inhalación reveló que es adecuado para los fines de clasificación y etiquetado (6). El método de las clases de toxicidad aguda por inhalación permite aplicar una progresión serial de concentraciones previamente definidas para obtener una escala de toxicidad de la sustancia problema. El criterio de valoración principal es la letalidad, pero los animales moribundos o que presenten signos de dolor, angustia o sufrimiento intenso y duradero deben sacrificarse de forma compasiva para minimizar su sufrimiento. Se recomienda consultar el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (7).

2. Se ofrece una guía para la realización e interpretación de estudios según este método de ensayo en el documento de orientación nº 39 sobre los ensayos de toxicidad por inhalación aguda (GD 39) (8).

3. Las definiciones empleadas en el contexto de este método de ensayo se facilitan en el apéndice 1 y en el documento GD 39 (8).

4. El método de ensayo proporciona información acerca de los factores de riesgo y facilita la ordenación y clasificación de la sustancia problema de conformidad con el Reglamento (CE) nº 1272/2008 en relación con la clasificación de las sustancias químicas que provocan toxicidad aguda (9). Cuando sea preciso calcular valores puntuales de CL50 o analizar la relación concentración-respuesta, el método de ensayo recomendable es el que se describe en el capítulo B.2 del presente anexo (1). Se ofrecen más orientaciones sobre la selección del método de ensayo en el documento de orientación (GD) nº 39 (8). El presente método de ensayo no ha sido concebido específicamente para el análisis de productos especializados, como materiales fibrosos o isométricos escasamente solubles o nanoproductos manufacturados.

### CONSIDERACIONES INICIALES

5. Antes de considerar la aplicación de este método de ensayo y con el fin de minimizar el sufrimiento animal, el laboratorio de análisis deberá tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia problema, sin olvidar los estudios existentes cuyos datos pudieran desaconsejar la realización de nuevas investigaciones. En la selección de la especie, cepa, sexo y modo de exposición más apropiados resulta útil toda información referente a: identidad, estructura química y propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema; resultados de anteriores ensayos de toxicidad *in vivo* o *in vitro*; uso(s) previsto(s) y posible exposición humana; datos de (Q)SAR previos y datos toxicológicos acerca de sustancias estructuralmente afines. No deberán investigarse con este método de ensayo concentraciones que previsiblemente provoquen un dolor o sufrimiento intensos debido a efectos corrosivos ([1]) o irritantes graves [véase el documento GD 39 (8)].

([1]) La evaluación de la corrosividad puede basarse en la opinión de expertos con información sobre: experiencia en animales y humanos, datos (*in vitro*) disponibles [capítulos B.40 (10) y B.40 *bis* (11) de este anexo y TG 435 de la OCDE (12)], valores de pH, información acerca de sustancias afines o cualesquiera otros datos pertinentes.

▼M4

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. El ensayo se basa en un procedimiento secuencial, en el que se obtiene suficiente información sobre la toxicidad aguda por inhalación de la sustancia problema durante un período de exposición de 4 horas, para permitir su clasificación. Pueden aplicarse otros tiempos de exposición con fines normativos específicos. Cada una de las fases de concentración definidas se investiga en 3 animales de cada sexo. Dependiendo del número de animales que se encuentren muertos o moribundos, pueden bastar 2 fases de concentración para evaluar la toxicidad aguda de la sustancia problema. Si hay indicios de que uno de los sexos es más sensible que el otro, la investigación debe proseguir únicamente con el sexo más sensible. El resultado de la fase preliminar determina cuál será la fase siguiente, de manera que:

a) no se requieran más ensayos,

b) se investiguen tres animales de cada sexo, o

c) se investiguen solo 6 animales del sexo más sensible; es decir, el cálculo del límite inferior de la clase tóxica debe basarse en 6 animales por grupo de concentración experimental, independientemente del sexo.

7. Los animales moribundos o que den muestras claras de dolor o muestren signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva y en la interpretación de los resultados serán considerados de la misma manera que los que hayan muerto durante el ensayo. En el documento de orientación nº 19 de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (7) se dan criterios para tomar la decisión de matar animales moribundos o sometidos a sufrimiento intenso y directrices para reconocer cuándo la muerte es previsible o inminente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

8. Hay que usar animales adultos jóvenes y sanos de una cepa de laboratorio corriente. La especie recomendada es la rata y, en caso de usar otra especie, se justificará debidamente.

**Preparación de los animales**

9. Las hembras deben ser nulíparas y no grávidas. El día de la exposición, los animales serán adultos jóvenes de 8 a 12 meses de edad y su peso corporal no se desviará en más del ± 20 % del peso medio de su sexo calculado en animales previamente expuestos de la misma edad. Los animales se seleccionan al azar y se marcan para permitir su identificación individual. Se mantiene a los animales en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio. Deberán también aclimatarse al equipo del ensayo durante un breve período preliminar, para así reducir el estrés provocado por la introducción en un entorno nuevo.

**Zootecnia**

10. La temperatura de los animalarios debe ser de 22 ± 3 °C. La humedad relativa se mantendrá idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, si bien esto no siempre es posible cuando se usa el agua como vehículo. Antes y después de las exposiciones, los animales deberán enjaularse en principio por grupos de sexo y nivel de exposición, pero el número de animales por jaula será tal que permita la observación sin trabas de cada animal y minimice las pérdidas por agresiones y canibalismo. Cuando la exposición es solo por la nariz, puede ser necesario aclimatar a los animales a los tubos de sujeción. Estos no deberán ejercer sobre los animales tensiones físicas, térmicas o de

▼M4

inmovilización. La sujeción puede influir en parámetros fisiológicos como la temperatura corporal (hipertermia) o el volumen respiratorio por minuto. Si se dispone de datos generales en el sentido de que no se producen estos cambios en medida apreciable, se podrá prescindir de la adaptación previa a los tubos de sujeción. Los animales expuestos de cuerpo entero a un aerosol se enjaularán de manera individual durante la exposición para evitar que el aerosol en estudio se filtre por el pelo de sus compañeros de jaula. Salvo durante la exposición, se podrán administrar las dietas habituales de laboratorio certificadas, acompañadas de un suministro ilimitado de agua potable de la traída municipal. Se aplicará iluminación artificial en una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

**Cámaras de inhalación**

11. Para seleccionar una cámara de inhalación se tendrán en cuenta la naturaleza de la sustancia problema y la finalidad del ensayo. El modo de exposición preferible es de solo por la nariz (término que abarca los modos de exposición solo por la cabeza, solo por la nariz y solo por el hocico). Este modo de exposición es el recomendado generalmente para los estudios de aerosoles líquidos o sólidos y de vapores que pueden condensarse formando aerosoles. Determinados objetivos de la investigación se podrían alcanzar mejor utilizando el modo de exposición de cuerpo entero, pero esto debe justificarse en el informe del estudio. Para asegurar la estabilidad atmosférica cuando se emplea una cámara de cuerpo entero, el volumen total de los animales experimentales no debe exceder del 5 % del volumen de la cámara. En el documento GD 39 (8) se describen los principios de las técnicas de exposición de cuerpo entero y de solo por la nariz y sus ventajas e inconvenientes respectivos.

CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

**Administración de las concentraciones**

12. Se recomienda un período de exposición prefijado de cuatro horas, sin contar el tiempo de equilibrado. El período puede variar dependiendo de las necesidades concretas, pero se justificarán los motivos en el informe del estudio [véase el documento GD 39 (8)]. Los animales expuestos en cámaras de cuerpo entero se enjaularán de manera individual para evitar la ingestión de la sustancia problema debido a las conductas de limpieza de los compañeros de jaula. Se suprimirá la alimentación durante el período de exposición. Se puede suministrar agua durante todo el período de exposición de cuerpo entero.

13. Los animales se exponen a la sustancia problema en forma de gas, vapor, aerosol o una mezcla de estos. Las condiciones físicas de la investigación dependerán de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, de la concentración seleccionada y/o de la forma física más probable que adoptará dicha sustancia durante su manipulación y administración. Las sustancias higroscópicas y químicamente reactivas deberán estudiarse en condiciones de aire seco. Se procurará evitar la acumulación de concentraciones explosivas.

**Distribución granulométrica**

14. Se controlará el tamaño de partícula en todos los aerosoles y vapores que puedan condensarse formando aerosoles. Para facilitar la exposición de todas las zonas de interés de las vías respiratorias, se recomiendan aerosoles que tengan un diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) de 1 a 4 μm, con una desviación típica geométrica (σg) en el intervalo de 1,5 a 3,0 (8) (13) (14). Se procurará dentro de lo razonable ajustarse a este marco de referencia, pero si ello no es posible se consultará la opinión de expertos. Por ejemplo, los humos metálicos pueden tener un diámetro de partícula menor, mientras que las partículas con carga, las fibras y las sustancias higroscópicas (que aumentan de tamaño en el medio húmedo de las vías respiratorias) pueden sobrepasar este límite de referencia.

▼M4

**Preparación de la sustancia problema en un vehículo**

15. Se puede recurrir a un vehículo para crear una concentración y un tamaño de partícula adecuados de la sustancia problema en la atmosfera. Por regla general se dará preferencia al agua. El material particulado se puede someter a tratamientos mecánicos para obtener la distribución granulométrica deseada, pero procurando no descomponer ni alterar la sustancia problema. Cuando se considere que los procesos mecánicos pueden haber alterado la composición de la sustancia problema (por ejemplo, las temperaturas extremas de una fricción excesiva), esta se verificará analíticamente. Se pondrá especial atención para no contaminar la sustancia problema. No es necesario analizar compuestos granulados no friables que han sido intencionadamente formulados como no inhalables. Se recurrirá a una prueba de desgaste para demostrar que no se generan partículas respirables durante la manipulación del material granulado. Si en la prueba de desgaste se generan partículas respirables, habrá que efectuar un ensayo de toxicidad por inhalación.

**Animales de control**

16. No es necesario emplear un grupo de control negativo (con aire) en paralelo. Si se usa un vehículo distinto del agua para generar la atmósfera experimental, solo será necesario recurrir a un grupo de control del vehículo cuando no se disponga de datos anteriores de toxicidad por inhalación. Si un ensayo de toxicidad de una sustancia problema formulada en un vehículo revela que no hay toxicidad, se deduce que el vehículo es atóxico a la concentración analizada; por lo tanto, no se precisa un control del vehículo.

SUPERVISIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXPOSICIÓN

**Caudal de aire de la cámara**

17. El caudal de aire de la cámara se controlará minuciosamente, se supervisará de manera continuada y se registrará como mínimo cada hora durante cada exposición. La supervisión de la concentración (o estabilidad) atmosférica del ensayo constituye una medida integral de todos los parámetros dinámicos y proporciona un medio indirecto de controlar todos los parámetros dinámicos de interés en la generación de un escenario atmosférico. Se pondrá especial atención para evitar la reinspiración en las cámaras de solo por la nariz en aquellos casos en los que el caudal de aire a través del sistema de exposición sea insuficiente para crear un flujo continuo del medio atmosférico de ensayo. Se han descrito metodologías capaces de demostrar que no tiene lugar la reinspiración en las condiciones operativas establecidas (8) (15). La concentración de oxígeno debe ser como mínimo del 19 %, y la de dióxido de carbono no debe superar el 1 %. Si existen razones para suponer que no están consiguiendo estos valores de referencia, habrá que determinar las concentraciones de ambos gases.

**Temperatura y humedad relativa de la cámara**

18. La temperatura de la cámara se mantendrá en 22 ± 3 °C. La humedad relativa en la zona de respiración de los animales, cuando se trata de exposiciones de solo por la nariz y de cuerpo entero, se supervisará y registrará al menos tres veces en operaciones de hasta 4 horas, y cada hora en operaciones más cortas. La humedad relativa debe mantenerse idealmente en el intervalo del 30 % al 70 %, pero este valor de referencia puede ser inalcanzable (por ejemplo, cuando se analizan mezclas acuosas) o imposible de medir (cuando hay interferencias de la sustancia con el método de ensayo).

▼M4

**Sustancia problema: concentración nominal**

19. Siempre que sea factible, se calculará y registrará la concentración nominal en la cámara de exposición. La concentración nominal es la masa de sustancia problema generada dividida por el volumen total de aire que recorre el sistema de la cámara. La concentración nominal no se usa para caracterizar la exposición de los animales, pero la comparación entre la concentración nominal y la real nos da un índice de la eficiencia generadora del sistema experimental, de modo que puede servir para detectar problemas en la generación de la atmósfera.

**Sustancia problema: concentración real**

20. La concentración real es la concentración de sustancia problema presente en la zona de respiración de los animales en una cámara de inhalación. Las concentraciones reales se pueden calcular con métodos específicos (por ejemplo, muestreo directo, métodos de adsorción o uso de reactivos químicos y posterior valoración analítica) o bien con métodos inespecíficos como la gravimetría por filtración. El análisis gravimétrico es aceptable exclusivamente para aerosoles de un único componente en polvo o de líquidos de baja volatilidad, y deberá sustentarse en caracterizaciones preliminares específicas de la sustancia de ensayo. La concentración de los aerosoles de polvos multicomponentes se puede determinar también por gravimetría. Sin embargo, hacen falta datos analíticos que demuestren que la composición del material aerotransportado es afín a la del material de partida. Si no se dispone de tal información, puede ser necesario repetir el análisis de la sustancia problema (idealmente, en estado aerotransportado) a intervalos regulares a lo largo del ensayo. Cuando se trate de productos en forma de aerosol capaces de evaporar o sublimar, habrá que demostrar que el método elegido es capaz de recoger todas las fases. En el informe del estudio se harán constar las concentraciones diana, nominales y reales, pero en los análisis estadísticos destinados a calcular los valores de concentración letal se emplean solo las concentraciones reales.

21. Se usará, a ser posible, un solo lote de sustancia problema, que se conservará en condiciones que preserven su pureza, homogeneidad y estabilidad. Antes de iniciar el estudio deberá hacerse una caracterización de la sustancia problema consistente en un análisis de pureza y, si es técnicamente factible, de identidad y de cuantificación de contaminantes e impurezas. Con este fin se pueden aportar, entre otros, los siguientes datos: tiempo de retención y área relativa del pico, peso molecular determinado mediante espectroscopia de masas o cromatografía de gases y otras determinaciones. Si bien la identidad de la muestra de ensayo no es responsabilidad del laboratorio de análisis, la prudencia aconseja que este confirme, aunque sea dentro de ciertos límites, la caracterización facilitada por el promotor (por ejemplo, color, naturaleza física, etc.).

22. La atmósfera de exposición se mantendrá constante en la medida de lo posible y bajo supervisión continua y/o intermitente, dependiendo del método analítico. Si la técnica de muestreo es intermitente, habrá que tomar muestras atmosféricas de la cámara por lo menos dos veces en un ensayo de cuatro horas. De no ser esto posible por darse concentraciones bajas o un caudal de aire limitado, se podrá tomar una muestra en todo el período de exposición. Si se producen fluctuaciones importantes de una muestra a otra, para analizar las siguientes concentraciones se tomarán cuatro muestras por exposición. Las concentraciones individuales medidas en la cámara no deben desviarse de la concentración media en ± 10 % cuando se trata de gases y vapores, y en ± 20 % en el caso de aerosoles de líquidos o sólidos. Se calculará y registrará el tiempo de equilibrado de la cámara ($t_{95}$). La duración de cualquier exposición abarca el tiempo que tarda en generarse la sustancia problema, lo que incluye el tiempo necesario para alcanzar $t_{95}$. Se ofrecen indicaciones para el cálculo de $t_{95}$ en el documento de orientación n$^{o}$ 39 (8).

▼M4

23. Cuando se manejan mezclas muy complejas de gases/vapores y aerosoles (por ejemplo, atmósferas de combustión y sustancias problema propulsadas con dispositivos/productos fabricados con fines determinados), cada fase puede comportarse de manera diferente en una cámara de inhalación, de modo que se seleccionará como mínimo una sustancia indicadora (analito), normalmente la sustancia activa principal de la mezcla, para cada fase (gas/vapor y aerosol). Si el producto analizado es una mezcla, habrá que documentar la concentración analítica de la mezcla total y no solo de la sustancia indicadora o del componente activo (analito). Se ofrece más información sobre las concentraciones reales en el documento de orientación nº 39 (8).

**Sustancia problema: distribución granulométrica**

24. La distribución granulométrica en los aerosoles se determinará al menos dos veces por cada período de exposición de 4 horas, empleando un impactador de cascada o un aparato alternativo como un medidor del tamaño aerodinámico de partícula. Si se puede demostrar la equivalencia de los resultados obtenidos con el impactador de cascada y con el aparato alternativo, entonces se podrá emplear este último durante todo el estudio. Se empleará un segundo dispositivo, como un filtro gravimétrico o un sistema de burbujeo o de purga, en paralelo con el equipo principal para confirmar la eficiencia de recogida de este último. La concentración en masa obtenida mediante análisis granulométrico tendrá unos límites de desviación razonables con respecto a la concentración en masa obtenida mediante gravimetría por filtración [véase el documento GD 39 (8)]. Si es posible demostrar su equivalencia en la fase inicial del estudio, podrán omitirse en lo sucesivo las pruebas confirmatorias. Por razones de bienestar animal, se tomarán medidas para minimizar la obtención de datos no concluyentes que obligarían a repetir la exposición. Se controlará el tamaño de partícula en los vapores cuando exista la posibilidad de que la condensación del vapor provoque la formación de un aerosol, o cuando se detecten partículas en una atmósfera de vapor que puedan inducir la mezcla de fases (véase el punto 14).

PROCEDIMIENTO

**Ensayo principal**

25. En cada fase se estudian tres animales de cada sexo, o bien seis animales del sexo más sensible. Cuando se exponen con la técnica de solo la nariz roedores distintos de la rata, podrán ajustarse los tiempos máximos de exposición para minimizar el sufrimiento específico de la especie. La concentración que se usará en la fase inicial se selecciona de entre una a cuatro concentraciones predefinidas, y debe ser aquella que provoque más probablemente toxicidad en algunos de los animales tratados. Los esquemas de ensayo de gases, vapores y aerosoles (apéndices 2 a 4) se articulan en torno a los valores de corte de las categorías 1-4 del Reglamento CLP (9) para gases (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 horas; apéndice 2), para vapores (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 horas; apéndice 3) y para aerosoles (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 horas; apéndice 4). La categoría 5, que no se contempla en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9), corresponde a concentraciones por encima de las respectivas concentraciones límite. A cada concentración inicial se le aplica el correspondiente esquema de ensayo. En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas hasta establecer una categoría.

26. El intervalo de tiempo entre los grupos de exposición se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. La exposición de los animales al siguiente nivel de concentración se retrasará hasta tener una seguridad razonable de la supervivencia de los animales previamente estudiados. Se recomienda un período de tres o cuatro días entre la administración de cada nivel de dosis para poder observar la toxicidad retardada. Este intervalo puede ajustarse según convenga, por ejemplo en caso de respuestas no concluyentes.

▼M4

**Ensayo límite**

27. El ensayo límite se practica cuando se sabe o supone que la sustancia problema es prácticamente atóxica, es decir, que induce una respuesta tóxica solo cuando supera la concentración límite normativa. Puede obtenerse información acerca de la toxicidad de la sustancia estudiada a partir de los conocimientos disponibles sobre sustancias o mezclas afines, teniendo en cuenta cuáles son los componentes que se sabe que son importantes desde el punto de vista toxicológico y en qué porcentaje aparecen. En situaciones en que se disponga de poca o ninguna información sobre la toxicidad de la sustancia o en las que se prevea que esta será tóxica, se llevará a cabo el ensayo principal [se ofrecen más indicaciones en el documento de orientación (GD) nº 39 (8)].

28. Según el procedimiento habitual se exponen tres animales de cada sexo, o seis animales del sexo más sensible, a concentraciones de 20 000 ppm de gases, 20 mg/l de vapores o 5 mg/l de polvos/nieblas, respectivamente y siempre que se puedan alcanzar, lo que constituye el ensayo límite de este método. Cuando se analicen aerosoles, el objetivo principal será obtener un tamaño de partícula respirable (es decir, un MMAD de 1-4 μm). El estudio de aerosoles a concentraciones mayores de 2 mg/l solo se emprenderá si se puede obtener un tamaño de partícula respirable [véase el documento GD 39 (8)]. De conformidad con el SGA (16), por razones de bienestar animal se desaconseja investigar más allá de las concentraciones límite. La realización de pruebas en la categoría 5 (16) del SGA, que no está recogida en el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9), solo se contemplará cuando haya muchas probabilidades de que sus resultados vayan a incidir directamente en la protección de la salud humana, lo cual deberá justificarse en el informe del estudio. Cuando se trate de sustancias problema potencialmente explosivas, se procurará evitar las condiciones favorables a una explosión. A fin de evitar el uso innecesario de animales, se hará una operación de prueba sin animales antes del ensayo límite, para confirmar que se crean en la cámara las condiciones adecuadas para dicho ensayo límite.

CONTEXTO

29. Los animales se someterán a observación clínica frecuente durante el período de exposición. Las observaciones clínicas se repetirán al menos dos veces el día de la exposición, o más frecuentemente si lo indica la respuesta de los animales al tratamiento, y en lo sucesivo al menos una vez al día durante un período total de 14 días. La duración del período de observación no es fija, antes bien deberá determinarse en función de la naturaleza y el tiempo de aparición de los signos clínicos y de la longitud del período de recuperación. Es importante conocer el momento en el que aparecen y desaparecen los signos de toxicidad, especialmente si hay tendencia a una aparición retardada de los signos tóxicos. Todas las observaciones se registrarán sistemáticamente en fichas individuales de cada animal. Por razones de bienestar animal, los animales moribundos o que den muestras de dolor o signos de sufrimiento intenso y continuo deben ser sacrificados de forma compasiva. En el momento de explorar los signos clínicos de toxicidad, se procurará que el mal aspecto inicial y los trastornos respiratorios transitorios, derivados del procedimiento de exposición, no se confundan con efectos relacionados con el tratamiento. Se tendrán en cuenta los principios y criterios resumidos en el documento de orientación sobre criterios de tratamiento compasivo [Humane Endpoints Guidance Document (7)]. Cuando se encuentre algún animal muerto o se sacrifique por razones compasivas, deberá registrarse con la mayor precisión posible el momento de la muerte.

▼M4

30. Las observaciones en de la jaula deberían incluir los cambios en la piel, pelo, ojos y membranas mucosas, y también los sistemas respiratorio, circulatorio, nervioso central y autónomo, así como la actividad somatomotriz y las pautas de comportamiento. Cuando sea posible se diferenciarán los efectos locales de los sistémicos. Debe prestarse atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma. El registro de la temperatura rectal puede ayudar a detectar una bradipnea refleja o una hipo/hipertermia relacionadas con el tratamiento o con el confinamiento.

**Peso corporal**

31. Los pesos corporales individuales se registrarán una vez durante el período de aclimatación, en el día previo a la exposición (día 0), y al menos en los días 1, 3 y 7 (y, en lo sucesivo, semanalmente) y en el momento de la muerte o la eutanasia si se produce después del día 1. Se acepta que el peso corporal es un indicador crítico de la toxicidad, por lo que deberán vigilarse estrechamente los animales que muestren una reducción progresiva de peso $\geq$ 20 % en comparación con los valores preliminares. Los animales supervivientes se pesan y se sacrifican de forma compasiva al final del período de post-exposición.

**Anatomía patológica**

32. Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueran durante su realización y los que se eliminen del estudio por razones de bienestar animal, se someterán a autopsia macroscópica. Si la autopsia no se puede practicar inmediatamente después de comprobar la muerte del animal, este será refrigerado (no congelado) a temperaturas suficientemente bajas para minimizar la autólisis. Las autopsias se practicarán lo antes posible, normalmente en el plazo de uno o dos días. Se documentarán todas las modificaciones anatomopatológicas macroscópicas observadas en cada animal, poniendo especial atención en las alteraciones de las vías respiratorias.

33. Se podrán contemplar otras exploraciones incluidas de antemano en el diseño para ampliar el valor interpretativo del estudio, como la medida del peso pulmonar de las ratas que sobrevivan o el examen microscópico de las vías respiratorias para aportar pruebas de irritación. La exploración de órganos puede extenderse a aquellos que muestran signos de anatomapatología macroscópica en los animales que sobreviven 24 o más horas y a los órganos que se saben o suponen afectados. El examen microscópico de la totalidad de las vías respiratorias puede proporcionar información útil en el caso de sustancias problema que son reactivas con el agua, como las de naturaleza ácida o higroscópica.

DATOS E INFORME

**Datos**

34. Se documentarán por separado los datos de peso corporal y los resultados de la autopsia de cada animal. Los resultados de la observación clínica se reunirán en un cuadro que presente, por cada grupo de ensayo, el número de animales utilizados, el número de animales que presenten signos específicos de toxicidad, el número de animales hallados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte de los distintos animales, la descripción y la evolución temporal de los efectos tóxicos y sin reversibilidad, y los resultados de la autopsia.

▼M4

**Informes de los ensayos**

35. El informe del ensayo debe incluir, en su caso, la información siguiente:

*Animales de experimentación y zootecnia*

— Descripción de las condiciones de enjaulado, tales como: número (o variación del número) de animales por jaula, materiales de cama, temperatura ambiente y humedad relativa, fotoperíodo e identificación de la dieta.

— Especie o variedad empleada y justificación del uso de una especie distinta de la rata.

— Número, edad y sexo de los animales.

— Método de asignación al azar.

— Pormenores de la calidad del alimento y el agua (incluido el tipo/origen de la alimentación y el origen del agua).

— Descripción de cualquier acondicionamiento previo al estudio, incluidos alimentación, cuarentena y tratamiento de enfermedades.

*Sustancia problema:*

— Naturaleza física, pureza y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (incluida la isomerización).

— Identificación química y número de registro del Chemical Abstracts Service (CAS), si se conoce.

*Vehículo:*

— Justificación del uso de un vehículo y justificación de la elección del mismo (si es distinto del agua).

— Datos históricos o paralelos que demuestren que el vehículo no interfiere en los resultados del estudio.

*Cámara de inhalación:*

— Descripción de la cámara de inhalación, incluidos las dimensiones y el volumen.

— Procedencia y descripción del equipo empleado para la exposición de los animales y la generación de la atmósfera.

— Equipo empleado para medir la temperatura, la humedad, el tamaño de partícula y la concentración real.

— Fuente de aire, tratamiento del aire suministrado/extraído y sistema de acondicionamiento.

— Métodos de calibración del equipo para garantizar una atmósfera experimental homogénea.

— Diferencia de presión (positiva o negativa).

— Puertos de exposición por cámara (de solo por la nariz); ubicación de los animales en el sistema (de cuerpo entero).

— Homogeneidad/estabilidad temporal de la atmósfera experimental.

— Localización de los sensores de temperatura y humedad, y muestreo de la atmósfera experimental en la cámara.

— Caudales de aire, caudal del aire por puerto de exposición (solo por la nariz) o carga de animales por cámara (de cuerpo entero).

— Descripción del equipo empleado para medir el oxígeno y el dióxido de carbono, si procede.

▼M4

— Tiempo necesario para alcanzar el equilibrio ($t_{95}$) en la cámara de inhalación.

— Número de variaciones de volumen por hora.

— Dispositivos de dosificación (si procede).

*Datos relativos a la exposición:*

— Justificación de la concentración diana seleccionada en el estudio principal.

— Concentraciones nominales (masa total de sustancia problema generada en la cámara de inhalación dividida por el volumen de aire que recorre la cámara).

— Concentraciones reales de la sustancia problema recuperadas en la zona de respiración de los animales; en el caso de mezclas que dan lugar a formas físicas heterogéneas (gases, vapores, aerosoles), se podrá analizar cada una de ellas por separado.

— Todas las concentraciones atmosféricas se registrarán en unidades de masa (mg/l, $mg/m^3$, etc.); se podrán indicar además las unidades de volumen (ppm, ppmm) entre paréntesis.

— Distribución del tamaño de partícula, diámetro aerodinámico mediano de masa (MMAD) y desviación típica geométrica (σg), incluidos los correspondientes métodos de cálculo; se documentarán los análisis granulométricos individuales.

*Condiciones del ensayo:*

— Descripción pormenorizada de la preparación de la sustancia problema y de cualquier método empleado para reducir el tamaño de partícula de las materias sólidas o preparar soluciones de la sustancia problema; cuando exista la posibilidad de que los procesos mecánicos hayan alterado la composición de la sustancia problema, se incluirán los resultados de los análisis realizados para verificar dicha composición.

— Descripción (preferiblemente acompañada de un diagrama) del equipo empleado para generar la atmósfera experimental y para exponer los animales a la misma.

— Descripción pormenorizada del método de análisis químico empleado y de la validación del método (incluida la eficiencia de recuperación de la sustancia problema en el medio ambiente experimental).

— Justificación de las concentraciones experimentales seleccionadas.

*Resultados:*

— Tabulación de los valores de temperatura de la cámara, humedad y caudal de aire.

— Tabulación de las concentraciones nominales y reales de la cámara.

— Tabulación de los datos de tamaño de partícula, incluidos los de recogida de muestras para el análisis, distribución granulométrica y cálculos de MMAD y $\sigma_g$.

— Tabulación de las respuestas y niveles de concentración de cada animal (es decir, animales que presenten signos de toxicidad, incluidas la mortalidad y la naturaleza, gravedad y duración de los efectos),

— Pesos corporales de cada animal registrados en el estudio; fecha y hora de la muerte si se produce antes de la eutanasia programada; cronología de la aparición de los signos de toxicidad e indicación de si estos son reversibles en cada animal.

▼M4

— Resultados de la autopsia y observaciones histopatológicas de cada animal, si se dispone de ellas.

— Categoría de la clasificación CLP y valor de corte de la $CL_{50}$.

*Evaluación e interpretación de los resultados:*

— Se hará especial hincapié en la descripción de los procedimientos empleados para cumplir los criterios del presente método de ensayo, esto es, la concentración límite o el tamaño de partícula.

— Se tomará en consideración la respirabilidad de las partículas a la luz de los resultados globales, de manera especial si no se cumplen los criterios relativos al tamaño de partícula.

— En la evaluación global del estudio se expondrá la coherencia de los métodos empleados para determinar las concentraciones nominales y reales y la relación entre ellas.

— Se explicará la causa probable de muerte y el mecanismo de acción (sistémico o local) predominante.

— Se facilitará una explicación de por qué ha sido preciso sacrificar de forma compasiva los animales con signos evidentes de dolor o de sufrimiento intenso y duradero, atendiendo a los criterios del documento de orientación de la OCDE sobre criterios de tratamiento compasivo (Guidance Document on Humane Endpoints) (7).

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Capítulo B.2 del presente anexo. Toxicidad aguda por inhalación.

(2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. Arch. Toxicol. 77: 243-254.

(3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. Arch. Toxicol. 71: 537-549.

(4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. ALTEX 1: 129-134.

(5) Capítulo B.1 *ter* del presente anexo. Toxicidad oral aguda. Método de las clases de toxicidad aguda.

(6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(9) Reglamento (CE) nº 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE, y se modifica el reglamento (CE) nº 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M4**

(10) Capítulo B.40 del presente anexo. Corrosión cutánea *in vitro*: ensayo de resistencia eléctrica transcutánea (RET).

(11) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo. Corrosión cutánea *in vitro*: ensayo con modelo de piel humana.

(12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [http://www.oecd.org/env/testguidelines]

(13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

(14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321-327.

(15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160-167

(16) Naciones Unidas (2007), Sistema globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), ST/SG/AC.10/30, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra. Disponible en la dirección: [http://www.unece.org.es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_s.html]

▼**M4**

*Apéndice 1*

DEFINICIÓN

**Sustancia problema:** cualquier sustancia o mezcla analizada mediante este método de ensayo.

▼M4

*Apéndice 2*

**Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de gases (ppm/4 horas)**

Observaciones generales ([1])

Por cada concentración inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

Apéndice 2a: concentración inicial de 100 ppm

Apéndice 2b: concentración inicial de 500 ppm

Apéndice 2c: concentración inicial de 2 500 ppm

Apéndice 2d: concentración inicial de 20 000 ppm

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

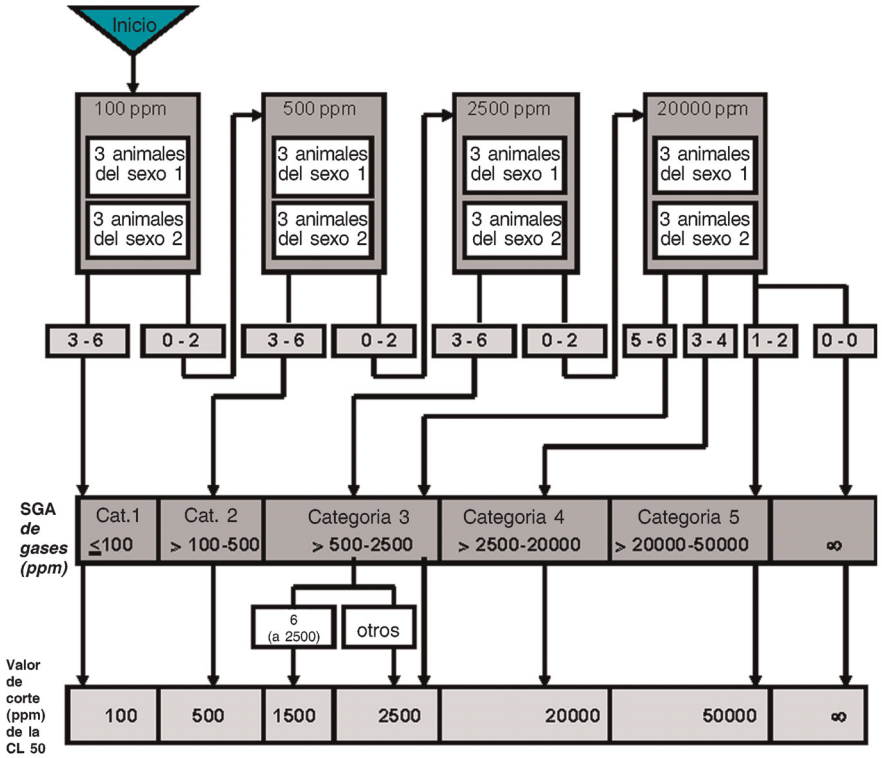
([1]) En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) nº 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

▼M4

*Apéndice 2a*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicialde 100 ppm/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

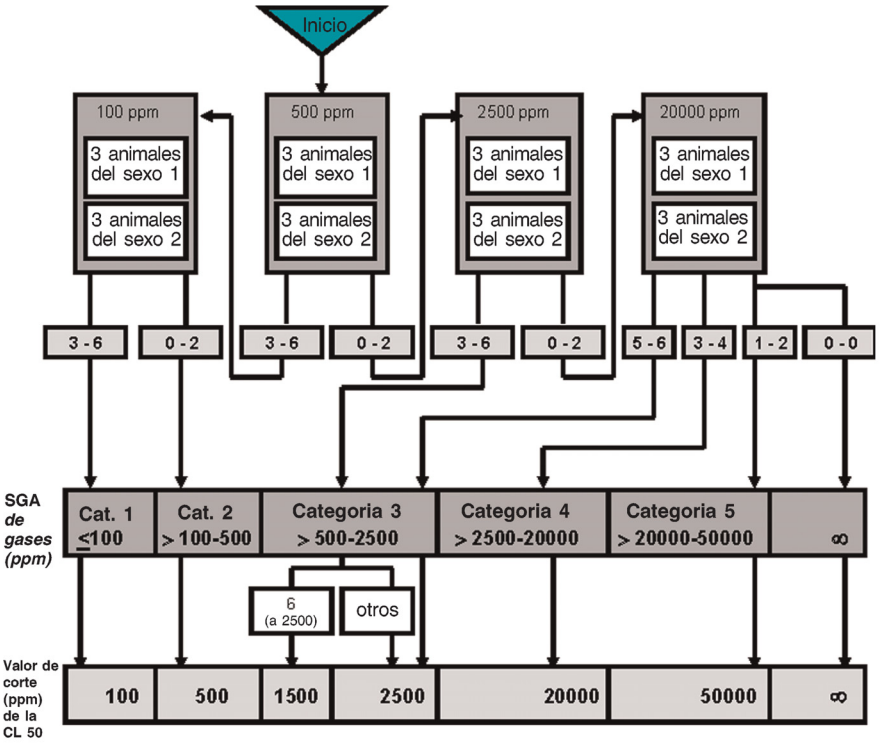
— Estudios con = 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 2b*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicialde 500 ppm/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

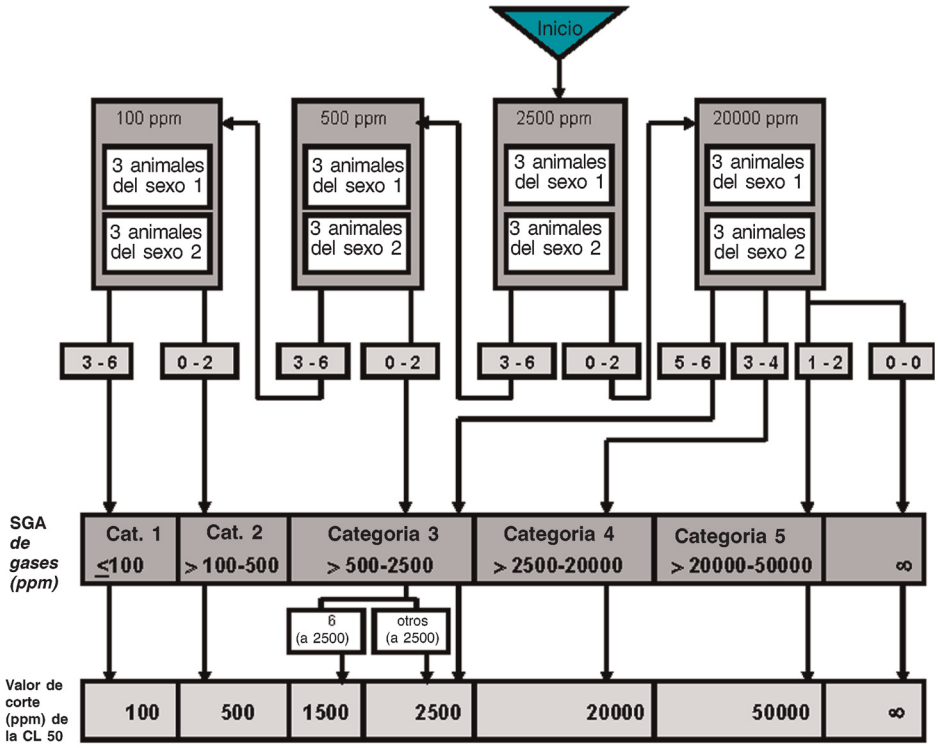
— Estudios con ≥ 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 2c*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicialde 2 500 ppm/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0–6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

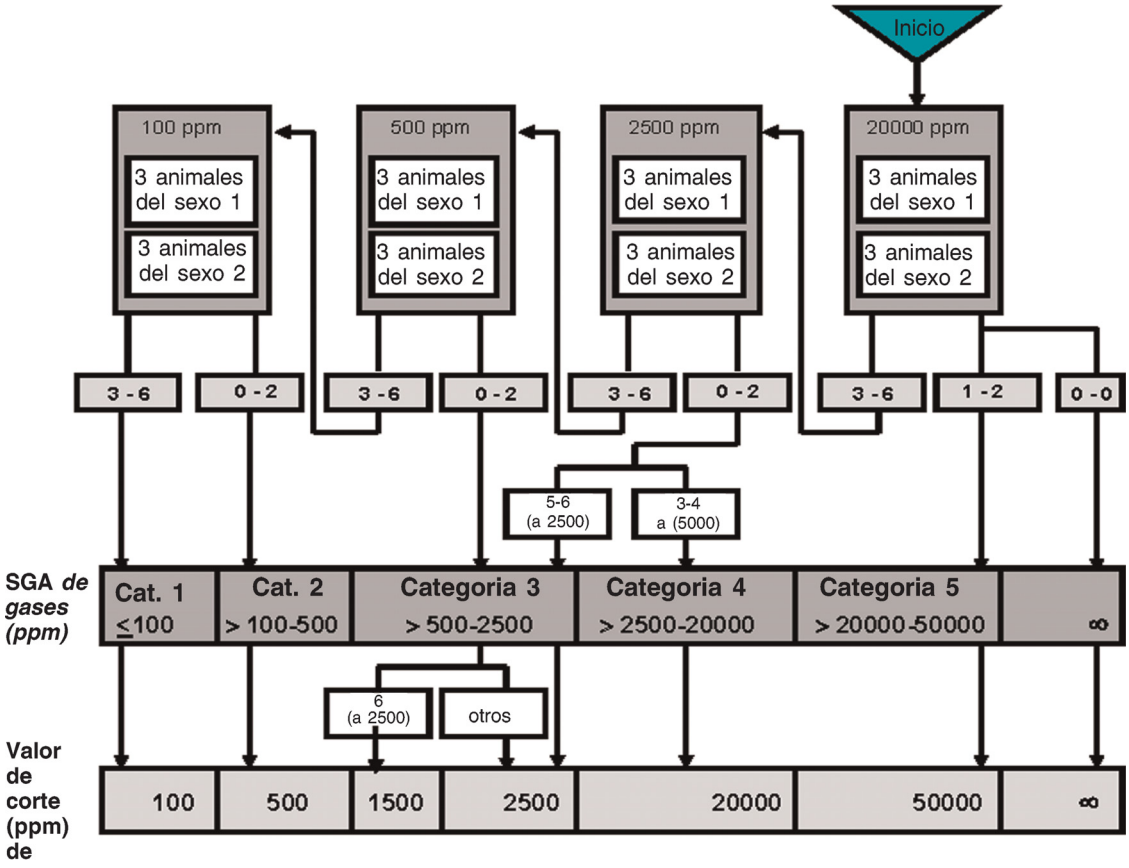
— Estudios con = 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 2d*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicialde 20 000 ppm/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

— Estudios con ≥ 20 000 ppm/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼**M4**

*Apéndice 3*

**Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de vapores (mg/l/4 horas)**

Observaciones generales ([1])

Por cada concentración inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

Apéndice 3a: concentración inicial de 0,5 mg/l

Apéndice 3b: concentración inicial de 2,0 mg/l

Apéndice 3c: concentración inicial de 10 mg/l

Apéndice 3d: concentración inicial de 20 mg/l

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

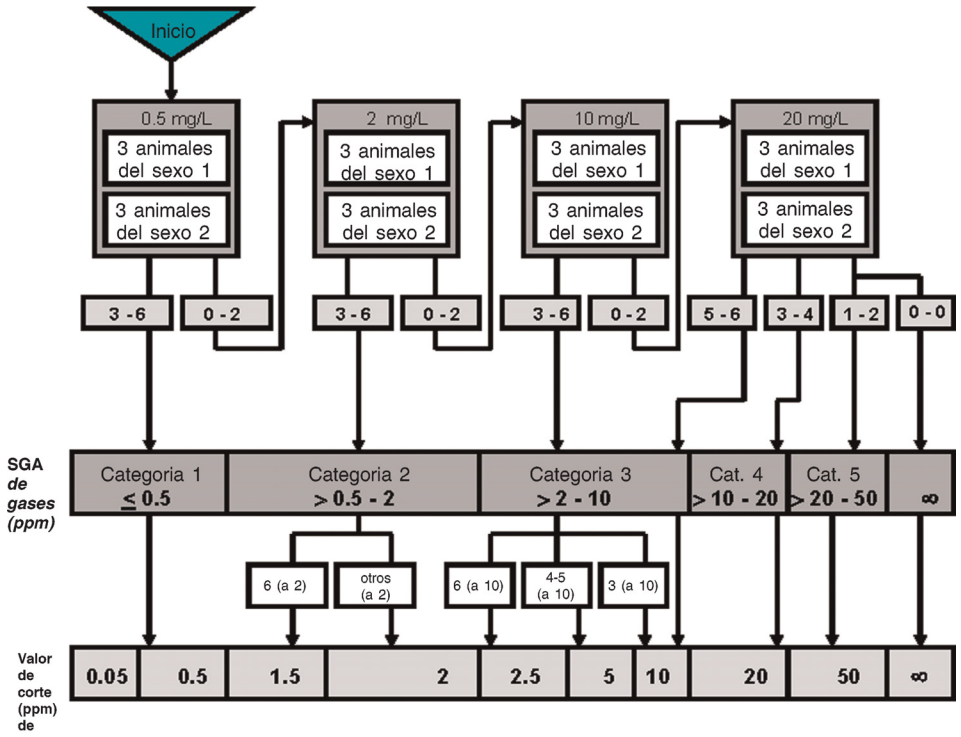
([1]) En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) nº 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

▼M4

*Apéndice 3a*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 0,5 mg/l/4 horas**



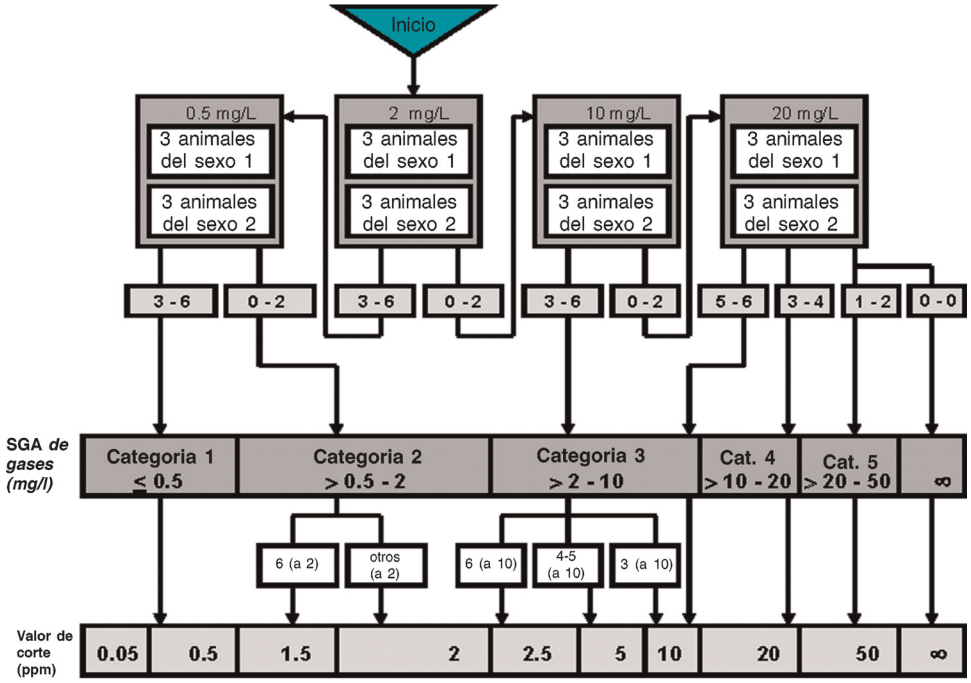

- En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
- 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
- SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos
- ∞: Sin dasificar
- Estudios con 50 mg/l4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 3b*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de gases con una concentración inicial de 2 mg/l/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0–6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

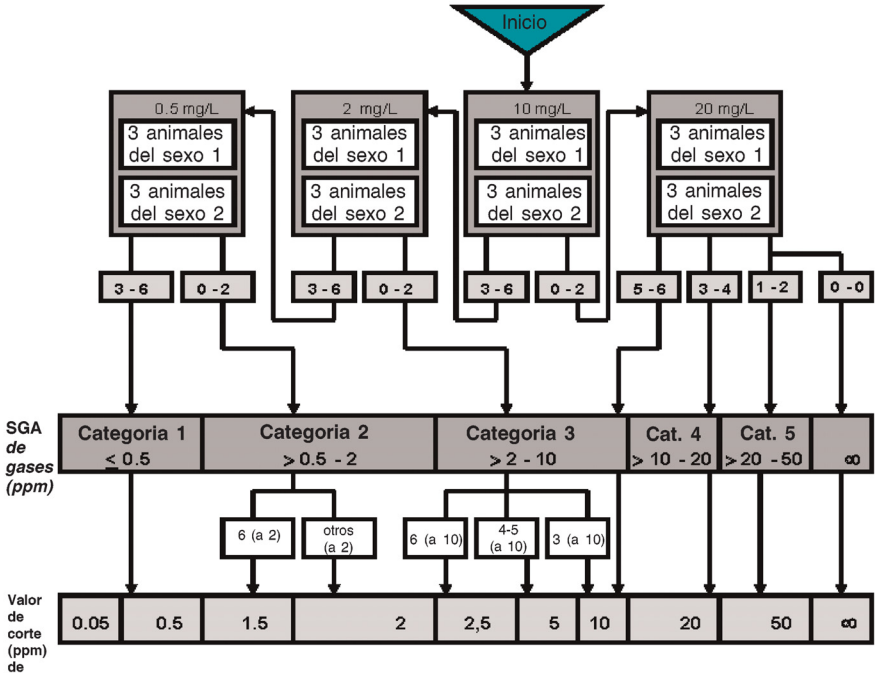
— Estudios con 50 mg/l4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 3c*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 10 mg/l/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0–6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin dasificar

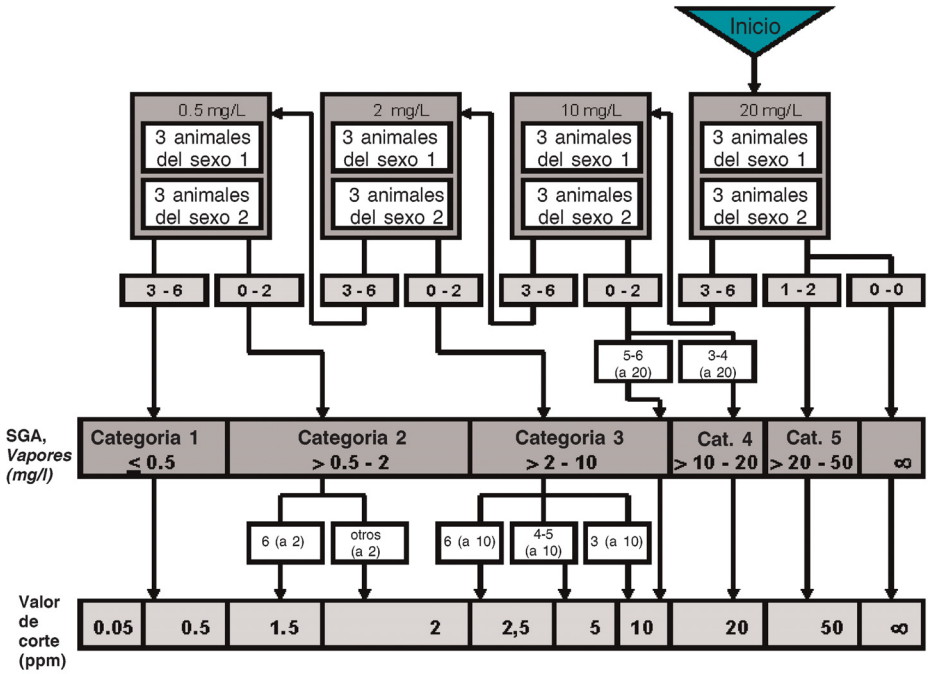
— Estudios con 50 mg/l4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 3d*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 20 mg/l/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: sin dasificar

— Estudios con 50 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼**M4**

*Apéndice 4*

**Procedimiento de ensayo según la concentración inicial en caso de aerosoles (mg/l/4 horas)**

Observaciones generales ([1])

Por cada concentración inicial, el procedimiento que debe seguirse se indica en los respectivos esquemas de ensayo que figuran en el presente anexo.

Apéndice 4a: concentración inicial de 0,05 mg/l

Apéndice 4b: concentración inicial de 0,5 mg/l

Apéndice 4c: concentración inicial de 1 mg/l

Apéndice 4d: concentración inicial de 5 mg/l

En función del número de animales muertos o sacrificados de forma compasiva, el procedimiento de ensayo seguirá las flechas indicadas.

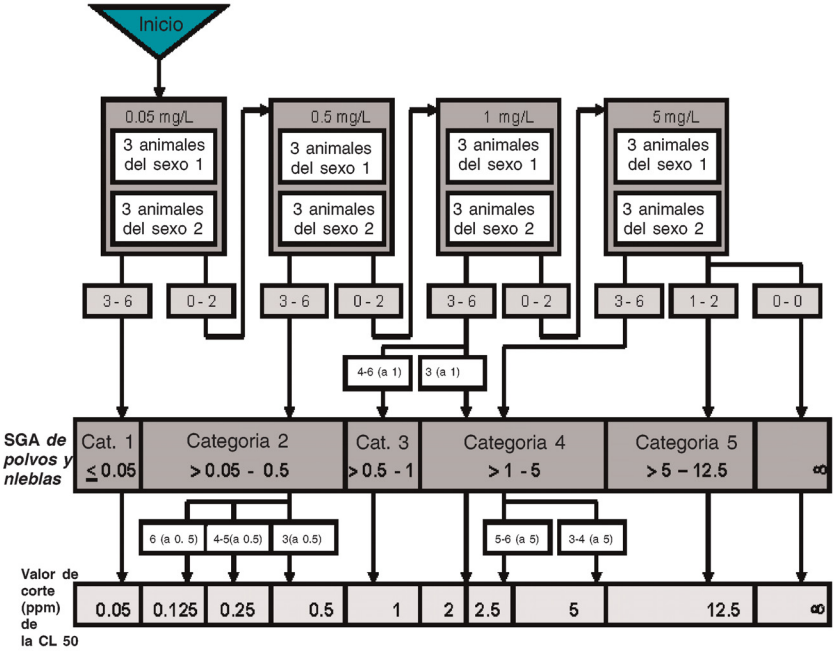
([1]) En los cuadros siguientes se hace referencia al SGA (sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos). El equivalente de la UE es el Reglamento (CE) nº 1272/2008. En el caso de la toxicidad aguda por inhalación, el Reglamento (CE) nº 1272/2008 (9) no contempla la categoría 5.

▼M4

*Apéndice 4a*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de vapores con una concentración inicial de 0,05 mg/l/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible

— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada

— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos

— ∞: Sin clasificar

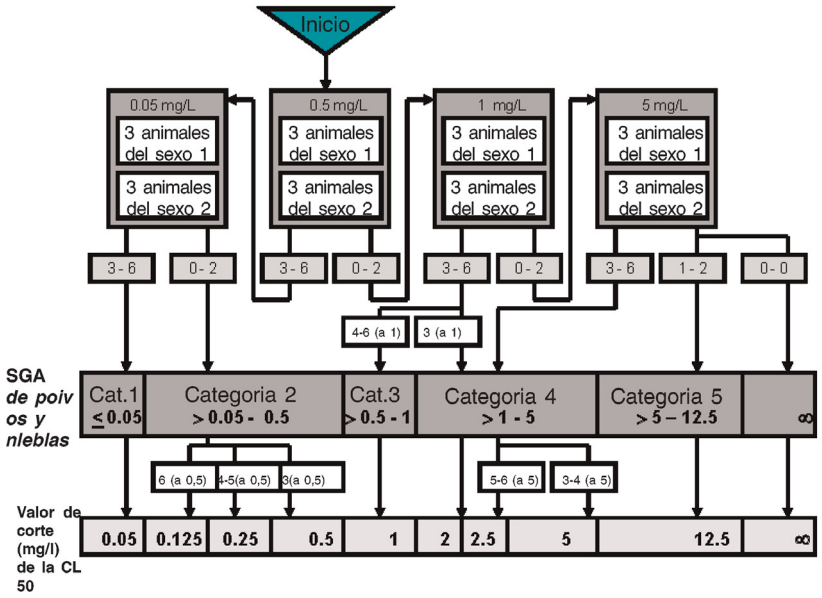
— Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 4b*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 0,5 mg/l/4 horas**



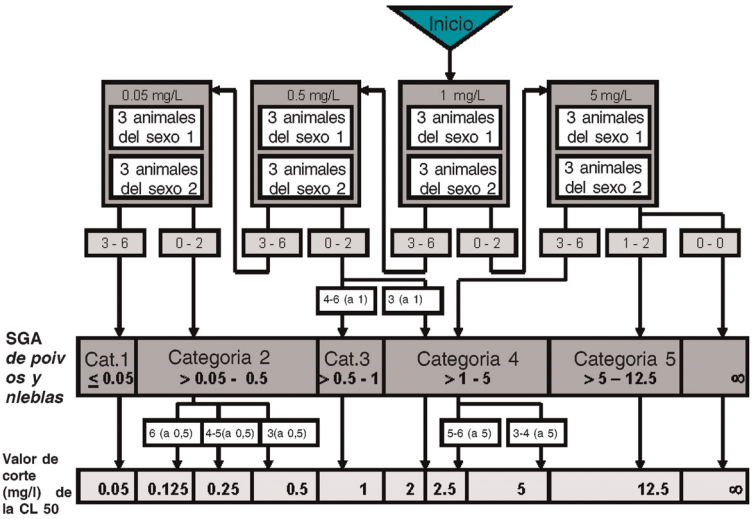

— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos
— ∞: Sin dasificar
— Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 4c*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 1 mg/l/4 horas**



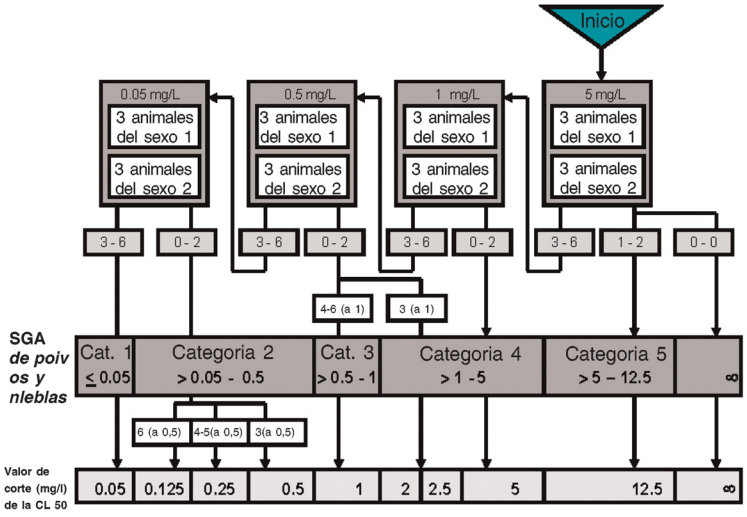

— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos
— ∞: Sin dasificar
— Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)

▼M4

*Apéndice 4d*

**Toxicidad aguda por inhalación:**

**Procedimiento de ensayo de aerosoles con una concentración inicial de 5 mg/l/4 horas**




— En cada fase se estudian 3 ♂ + 3 ♀, o bien 6 animales del sexo más sensible
— 0-6: número de animales muertos o moribundos por concentración estudiada
— SGA: sistema globalmente armonizado de dasificación y etiquetado de productos químicos
— ∞: Sin dasificar
— Estudios con 12,5 mg/l/4 horas: véase el documento de orienatación nº 39(8)»

▼M5

## B.53. ESTUDIO DE NEUROTOXICIDAD PARA EL DESARROLLO

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 426 (2007). En Copenhague, en junio de 1995, un grupo de trabajo de la OCDE sobre toxicidad para la reproducción y el desarrollo debatió la necesidad de actualizar las vigentes directrices de ensayo de la OCDE sobre la toxicidad para la reproducción y el desarrollo, así como de elaborar nuevas directrices sobre parámetros aún no incluidos (1). El grupo de trabajo recomendó que se escribieran unas directrices de ensayo sobre la neurotoxicidad para el desarrollo, sobre la base de unas directrices de la Agencia de Protección del Medio Ambiente estadounidense (EPA), que después han sido revisadas (2). En junio de 1996 se celebró en Copenhague una segunda reunión de consulta para facilitar a la Secretaría orientaciones para el esbozo de unas nuevas directrices de ensayo sobre la neurotoxicidad para el desarrollo, incluidos los principales elementos como, por ejemplo, los datos sobre la elección de la especie animal, el período de administración, el período de las pruebas, los parámetros que deben evaluarse, y los criterios para la evaluación de los resultados. En 1998 se publicaron unas directrices de evaluación del riesgo de neurotoxicidad de EE. UU. (3). En octubre de 2000 se celebraron consecutivamente una reunión de consulta de expertos de la OCDE y un taller del Instituto de Ciencias del Riesgo del ILSI, y en 2005 tuvo lugar en Tokio una reunión de consulta de expertos. Estas reuniones se celebraron para debatir las cuestiones científicas y técnicas relacionadas con las vigentes directrices de ensayo, y en ellas se elaboraron recomendaciones (4)(5)(6)(7) que se tuvieron en cuenta para desarrollar el presente método de ensayo. En los documentos de orientación de la OCDE nº 43 sobre 'Reproductive Toxicity Testing and Assessment' (Ensayo y evaluación de la toxicidad para la reproducción) (8) y nº 20 sobre 'Neurotoxicity Testing' (Ensayo de la neurotoxicidad) (9) se encuentra información adicional sobre la realización, interpretación y terminología correspondientes al presente método de ensayo.

### CONSIDERACIONES INICIALES

2. Se sabe que una serie de sustancias produce efectos neurotóxicos en el desarrollo de los seres humanos y de otras especies (10)(11)(12)(13). Con el fin de valorar y evaluar las características tóxicas de una sustancia puede ser necesario determinar su posible neurotoxicidad para el desarrollo. Se han diseñado estudios de neurotoxicidad para el desarrollo con el fin de ofrecer datos, incluida la caracterización de la relación dosis-respuesta, en relación con los posibles efectos funcionales y morfológicos sobre el sistema nervioso en desarrollo de la descendencia que puedan derivarse de la exposición durante la gestación y durante las primeras fases de la vida.

3. El estudio de la neurotoxicidad para el desarrollo puede llevarse a cabo como estudio aparte, incorporarse en un estudio de la toxicidad para la reproducción o de la neurotoxicidad para los adultos [por ejemplo, métodos de ensayo B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)], o añadirse a un estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal [por ejemplo, método de ensayo B.31 (17)]. Cuando el estudio de neurotoxicidad para el desarrollo está incorporado o añadido a otro estudio, es imperativo preservar la integridad de los dos tipos de estudios. Todos los ensayos deben cumplir la legislación aplicable o las directrices gubernamentales o institucionales para el uso de animales de laboratorio en la investigación (por ejemplo, 18).

4. Antes de efectuar el estudio, el laboratorio de ensayo debe considerar toda la información disponible sobre la sustancia problema. Tal información ha de incluir la identidad y la estructura de la sustancia, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de otros eventuales ensayos de toxicidad *in vitro* o *in vivo* efectuados con ella, los datos toxicológicos disponibles sobre sustancias relacionadas estructuralmente, y el uso o usos previstos de la sustancia. Esta información es necesaria para que todos los interesados puedan estar seguros de que el ensayo es pertinente para la protección de la salud humana, y ayudará a la selección de una dosis inicial adecuada.

▼M5

PRINCIPIO DEL ENSAYO

5. La sustancia problema se administra a los animales durante la gestación y lactancia. Se someten a ensayo animales madres para evaluar los efectos en las hembras gestantes y lactantes y también para obtener información comparativa (madres/descendientes). Se seleccionan aleatoriamente descendientes dentro de las camadas para realizar la evaluación de la neurotoxicidad. Esta evaluación consiste en realizar observaciones para detectar anomalías conductuales y neurológicas macroscópicas, incluida la evaluación del desarrollo físico, la ontogenia del comportamiento, la actividad motriz, las funciones motrices y sensitivas, y el aprendizaje y la memoria, así como la evaluación del peso del encéfalo y de la neuropatología durante el período de desarrollo postnatal y la edad adulta.

6. Cuando el método de ensayo se lleva a cabo como estudio aparte, pueden utilizarse animales disponibles adicionales de cada grupo para aplicarles procedimientos específicos neuroconductuales, neuropatológicos, neuroquímicos o electrofisiológicos, con el fin de completar los datos obtenidos a partir de los exámenes recomendados por este método de ensayo (16)(19)(20)(21). Los procedimientos complementarios pueden ser especialmente útiles cuando la observación empírica, los efectos previstos o el mecanismo o modo de acción indiquen un tipo determinado de neurotoxicidad. Estos procedimientos complementarios pueden utilizarse con las madres y también con las crías. Además, pueden utilizarse también procedimientos *ex vivo* o *in vitro,* en la medida en que dichos procedimientos no alteren la integridad de los procedimientos *in vivo.*

PREPARACIÓN DEL ENSAYO

**Selección de la especie animal**

7. La especie de ensayo preferida es la rata, pero pueden utilizarse otras especies cuando sea pertinente. Téngase en cuenta, no obstante, que los días de gestación y postnatales especificados en este método de ensayo son específicos de las cepas de ratas utilizadas habitualmente, y deben seleccionarse días comparables si se utiliza una especie diferente o una cepa poco usual. La utilización de otra especie debe justificarse con datos toxicológicos, farmacocinéticos o de otro tipo. La justificación debe incluir la disponibilidad de evaluaciones neuroconductuales y neuropatológicas postnatales propias de la especie. Si existe un ensayo anterior que haya suscitado inquietud, debe considerarse utilizar la especie o cepa que haya suscitado tal inquietud. Debido a las diferencias de comportamiento que presentan las diferentes cepas de rata, debe demostrarse que la cepa seleccionada para su uso presenta una fecundidad y una capacidad de respuesta adecuadas. Deben estar documentadas la fiabilidad y la sensibilidad de otras especies para detectar la neurotoxicidad para el desarrollo.

**Condiciones de alojamiento y alimentación**

8. El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 ± 3 °C. Aunque la humedad relativa ha de ser, como mínimo, del 30 % y preferentemente sin superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local, lo ideal es que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. La iluminación será artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. También es posible invertir el ciclo de luz antes del apareamiento y en toda la duración del estudio, a fin de efectuar las evaluaciones de los parámetros funcionales y de comportamiento durante el período de oscuridad (con luz roja), es decir, durante el tiempo en que los animales están normalmente activos (22). Los eventuales cambios en el ciclo de luz-oscuridad deben incluir un tiempo adecuado de aclimatación para que los animales puedan adaptarse al nuevo ciclo. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua a voluntad. Los tipos de alimentos y de agua deben notificarse y ambos elementos deben analizarse para la detección de eventuales contaminantes.

▼M5

9. Los animales pueden enjaularse por separado o en pequeños grupos del mismo sexo. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Una vez comprobado el apareamiento o como tarde el día 15 de la gestación, los animales que se hayan apareado deben colocarse por separado en jaulas preparadas para el parto y la maternidad. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la puesta de los animales en las mismas sean mínimos. Cuando se acerque la fecha del parto, a las hembras apareadas se les proporcionará material adecuado y determinado de nidificación. Se sabe que el estrés o la manipulación indebida durante la gestación pueden ocasionar resultados adversos, como muerte fetal y alteraciones del desarrollo fetal y postnatal. Para prevenir las muertes fetales debidas a factores ajenos al tratamiento, los animales deben tratarse con precaución durante la gestación, y debe evitarse el estrés debido a factores externos como el ruido excesivo.

**Preparación de los animales**

10. Deben emplearse animales sanos, que estén aclimatados a las condiciones del laboratorio y que no se hayan sometido a experimentos previos, a menos que el estudio esté incorporado a otro estudio (véase el punto 3). Deben caracterizarse los animales de experimentación en cuanto a su especie, cepa, procedencia, sexo, peso y edad. A cada animal se le debe asignar un número de identificación único, con el que estará marcado. Los animales de todos los grupos de ensayo han de ser tan homogéneos como resulte posible en cuanto a su peso y edad, y deben estar en el intervalo normal de la especie y cepa en estudio. Deben emplearse hembras adultas jóvenes y nulíparas para cada dosis. Los hermanos no deben aparearse, y debe prestarse atención para garantizar este extremo. El día de gestación (DG) 0 es el día en el que se observa la presencia de un tapón vaginal o de semen. Debe dejarse un tiempo adecuado de aclimatación (por ejemplo, de 2 o 3 días), al comprar a un proveedor animales con un tiempo conocido de gestación. Las hembras apareadas se deben repartir sin sesgos entre los grupos tratados y los de control, y en la medida de lo posible deben distribuirse de manera equilibrada entre los grupos (por ejemplo, se recomienda un procedimiento aleatorio estratificado para conseguir una distribución equilibrada entre todos los grupos, tal como el basado en el peso corporal). Las hembras inseminadas por un mismo macho deben repartirse de forma igualitaria entre los grupos.

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

11. Cada grupo tratado y de control debe incluir un número suficiente de hembras grávidas que se expondrán a la sustancia problema a fin de conseguir un número adecuado de descendientes para la evaluación de la neurotoxicidad. Se recomienda un total de 20 camadas para cada nivel de dosis. Se permiten diseños de la administración en grupos duplicados y en grupos escalonados siempre que se consiga el número total de camadas por grupo y se utilicen modelos estadísticos adecuados para tener en cuenta las duplicaciones.

12. En el día postnatal (DPN) 4 (el DPN 0 es el del parto) o antes del mismo, se debe ajustar el tamaño de cada camada mediante la eliminación de las crías sobrantes por selección aleatoria para obtener un tamaño uniforme de todas las camadas (23). El tamaño de la camada no debe superar el tamaño medio de las camadas de la cepa de roedores utilizados (8-12). Las camadas deben tener, en la medida de lo posible, un número igual de crías machos y hembras. No es apropiada la eliminación selectiva de las crías, por ejemplo en función del peso corporal. Tras la normalización de las camadas (sacrificio de las crías sobrantes) y antes de realizar las pruebas de los parámetros funcionales, las crías concretas que se asignen a los ensayos anteriores o posteriores al destete deben identificarse de manera inequívoca, utilizando cualquier método no cruel adecuado a tal fin (por ejemplo, 24).

▼M5

**Asignación de los animales a los ensayos funcionales y de comportamiento, pesajes del encéfalo y evaluaciones neuropatológicas**

13. El método de ensayo permite diferentes enfoques con respecto a la asignación de animales expuestos en el útero y a través de la lactancia a ensayos funcionales y de comportamiento, determinación de la maduración sexual, pesaje del encéfalo, y evaluación neuropatológica (25). Se pueden añadir otros ensayos de la función neuroconductual (por ejemplo, el comportamiento social), de neuroquímica o de neuropatología según cada caso, siempre que no se vea comprometida la integridad de los ensayos originales requeridos.

14. Se seleccionan las crías de cada grupo de dosis y se asignan para la evaluación de los parámetros el DPN 4 o después. Deben seleccionarse las crías de tal modo que, en la medida de lo posible, estén representados igualmente en todas las pruebas los dos sexos de cada camada en cada grupo de dosis. Para el ensayo de la actividad motriz, debe someterse a ensayo el mismo par de crías machos y hembras a todas las edades antes del destete (véase el punto 35). Para todos los demás ensayos, es posible asignar a las diferentes pruebas de comportamiento el mismo par de animales machos y hembras u otros distintos. Puede ser necesario asignar crías diferentes a los ensayos de la función cognitiva de animales destetados frente a los de animales adultos con el fin de evitar la confusión entre los efectos de la edad y los del entrenamiento previo sobre estas mediciones (26)(27). En el momento del destete (DPN 21), las crías que no se hayan seleccionado para algún ensayo pueden desecharse de forma compasiva. Todas las eventuales alteraciones de las asignaciones de las crías deben recogerse en el informe. La unidad estadística de medida debe ser la camada (o la madre) y no la cría.

15. Existen diversas maneras de asignar las crías a los exámenes anteriores y posteriores al destete, ensayos cognitivos, exámenes patológicos, etc. (véase la figura 1 en cuanto al diseño general y el apéndice 1 en cuanto a ejemplos de asignación). Los números mínimos recomendados de animales en cada grupo tratado para los exámenes anteriores y posteriores al destete son los siguientes:

| | |
|---|---|
| Observaciones clínicas y de peso corporal | Todos los animales |
| Observaciones clínicas detalladas | 20/sexo (1/sexo/camada) |
| Peso del encéfalo (tras la fijación) DPN 11-22 | 10/sexo (1/camada) |
| Peso del encéfalo (sin fijar) ~ DPN 70 | 10/sexo (1/camada) |
| Neuropatología (fijación por inmersión o perfusión) DPN 11-22 | 10/sexo (1/camada) |
| Neuropatología (fijación por perfusión) ~ DPN 70 | 10/sexo (1/camada) |
| Maduración sexual | 20/sexo (1/sexo/camada) |
| Otros parámetros del desarrollo (optativos) | Todos los animales |
| Ontogenia del comportamiento | 20/sexo (1/sexo/camada) |
| Actividad motriz | 20/sexo (1/sexo/camada) |
| Funciones motrices y sensitivas | 20/sexo (1/sexo/camada) |
| Aprendizaje y memoria | 10/sexo ([a]) (1/camada) |

([a]) Dependiendo de la sensibilidad de los ensayos de la función cognitiva, debe considerarse a veces la investigación de un número mucho más elevado de animales, por ejemplo, hasta 1 macho y 1 hembra por camada (sobre las asignaciones de animales, véase el apéndice 1) [se encuentra más información sobre el tamaño de la muestra en el documento de orientación de la OCDE 43 (8)].

▼M5

**Posología**

16. Se emplean al menos tres dosis de ensayo y un grupo de control en paralelo. Las dosis han de ser espaciadas para obtener una gradación de efectos tóxicos. Salvo cuando esté limitada por la naturaleza fisicoquímica o las propiedades biológicas de la sustancia, la dosis más elevada debe elegirse de forma que induzca cierta toxicidad para la madre (por ejemplo, signos clínicos, descenso del aumento de peso corporal (en no más del 10 %), o pruebas de toxicidad limitante de la dosis en un órgano diana). La dosis más alta puede limitarse a 1 000 mg/kg/día de peso corporal, con algunas excepciones; por ejemplo, la exposición humana prevista puede indicar la necesidad de utilizar una dosis superior. Otra posibilidad consiste en realizar estudios piloto o estudios preliminares para determinar el intervalo de concentraciones, a fin de establecer la dosis máxima utilizable que debe producir un grado mínimo de toxicidad para la madre. Si se ha comprobado que la sustancia problema es tóxica para el desarrollo, ya sea en un estudio normal de toxicidad para el desarrollo o en un estudio piloto, la dosis más alta debe ser la dosis máxima que no induce toxicidad excesiva para los descendientes ni muerte fetal o neonatal ni malformaciones, lo que sería suficiente para no permitir una evaluación significativa de la neurotoxicidad. La dosis más baja debe aspirar a no provocar ningún signo de toxicidad para la madre ni para el desarrollo, incluida la neurotoxicidad. Debe seleccionarse una secuencia decreciente de dosis con vistas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la existencia de un nivel sin efectos adversos observados (NOAEL), o dosis cerca del límite de detección que permitan la determinación de una dosis de referencia. Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer las dosis decrecientes y a menudo es preferible añadir un cuarto grupo de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis.

17. Las dosis deben establecerse tomando en consideración todos los datos disponibles sobre la toxicidad y la información complementaria relativa al metabolismo y la toxicocinética de la sustancia problema o productos afines. Dicha información puede ayudar asimismo a justificar la pertinencia de la posología. Debe considerarse la administración directa de dosis a las crías en función de la información sobre la exposición y la farmacocinética (28)(29). Antes de realizar estudios de administración directa de dosis deben considerarse cuidadosamente sus ventajas e inconvenientes (30).

18. El grupo de control en paralelo debe ser un grupo de control que no recibe tratamiento, o un grupo de control del vehículo si se utiliza este para administrar la sustancia problema. En principio, todos los animales deben recibir el mismo volumen de sustancia problema o de vehículo por unidad de peso corporal. Si se utiliza un vehículo u otro aditivo para facilitar la administración, debe atenderse a las siguientes características: efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de la sustancia problema; efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia problema que puedan modificar sus características de toxicidad; y efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales. El vehículo no debe provocar efectos que puedan interferir con la interpretación del estudio y tampoco debe ser tóxico neuroconductual ni afectar a la reproducción o al desarrollo. En caso de nuevos vehículos, debe incluirse un grupo de control que no reciba tratamiento, además de un grupo de control del vehículo. Los animales del grupo o grupos de control deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo.

▼M5

**Administración de las dosis**

19. La sustancia problema o el vehículo deben administrarse por la vía más pertinente para la posible exposición humana, y sobre la base de la información disponible relativa al metabolismo y distribución en los animales de ensayo. La vía de administración será generalmente oral (por ejemplo, vía oral forzada, con la alimentación, con el agua de bebida), pero pueden utilizarse otras vías (por ejemplo, cutánea, por inhalación), en función de las características y de las vías de exposición humana previstas o conocidas (se dan más orientaciones en el documento de orientación 43 (8). Debe facilitarse una justificación de la vía de administración elegida. La sustancia problema debe administrarse todos los días a la misma hora más o menos.

20. La dosis administrada a cada animal debe basarse normalmente en la última determinación del peso corporal. No obstante, hay que ser prudente al adaptar la dosis en el último tercio de la gestación. Si se observa una toxicidad excesiva en las madres tratadas, estas deberán sacrificarse por métodos compasivos.

21. La sustancia problema o el vehículo deben administrarse como mínimo una vez al día a las hembras apareadas desde el momento de la implantación (DG 6) hasta el final de la lactancia (DPN 21), de forma que las crías estén expuestas a la sustancia durante su desarrollo neurológico, tanto pre como postnatal. La edad a la que se inicia la administración, así como la duración y la frecuencia de esta, podrán ajustarse en caso de que haya pruebas que apoyen otro diseño experimental más pertinente para la exposición humana. La duración de la administración debe ajustarse en caso de que se utilicen otras especies, para garantizar la exposición durante todas las fases tempranas del desarrollo del encéfalo (es decir, las equivalentes al crecimiento del encéfalo humano en los períodos prenatal y postnatal temprano). La administración puede comenzar desde el inicio de la gestación (DG 0), aunque debe prestarse atención al potencial de la sustancia problema para causar la muerte del embrión antes de la implantación. Si la administración comenzara el DG 6 se evitaría este riesgo, pero no se tratarían las fases de desarrollo entre los DG 0 y 6. Cuando un laboratorio compra animales ya apareados, es imposible comenzar la administración el DG 0, por lo que el DG 6 sería una buena opción para empezarla. El laboratorio de ensayo debe fijar la posología según la información pertinente disponible sobre los efectos de la sustancia problema, la experiencia previa y las consideraciones logísticas; puede incluirse la continuación de la administración pasado el destete. No debe administrarse la sustancia problema el día del parto a los animales que no hayan terminado de parir completamente. En general, se acepta que la exposición de las crías tiene lugar a través de la leche materna; sin embargo, debe considerarse la administración directa de la sustancia a las crías en los casos en que falten pruebas de la continuidad de la exposición de la descendencia. Pueden obtenerse estas pruebas de que la exposición continúa a partir de, por ejemplo, la información farmacocinética, la toxicidad para la descendencia o cambios en biomarcadores (28).

OBSERVACIONES

**Observaciones sobre las madres**

22. Todas las madres deben observarse cuidadosamente al menos una vez al día para comprobar su estado de salud, incluida la morbimortalidad.

23. Durante los períodos de tratamiento y de observación, deben realizarse periódicamente (al menos dos veces durante el período de administración en la gestación y dos veces durante el período de administración en la lactancia) observaciones clínicas más detalladas, utilizando al menos diez madres por nivel de dosis. Los animales serán observados, fuera de su jaula de alojamiento, por técnicos especializados que no estén advertidos del tratamiento de los animales, utilizando procedimientos normalizados para minimizar el estrés de los animales y los sesgos de los observadores, y maximizar la fiabilidad entre los observadores. Cuando sea posible, se recomienda que todas las observaciones de un determinado estudio sean hechas por el mismo técnico.

▼M5

24. La presencia de signos observados debe consignarse. Siempre que sea factible, se registrará también la magnitud de los signos observados. Las observaciones clínicas deben incluir, entre otras cosas, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, la presencia de secreciones y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, pauta inusual de respiración y/o respiración por la boca, y cualquier signo anómalo de micción o defecación).

25. También habrá de anotarse cualquier respuesta no habitual en lo que se refiere a la posición del cuerpo, el nivel de actividad (por ejemplo, aumento o disminución de la exploración de la zona normal) y la coordinación de los movimientos. Deben registrarse también los cambios observados en la marcha (por ejemplo, contoneo o ataxia), postura (por ejemplo, espalda encorvada) y respuesta a la manipulación, a la colocación o a otros estímulos ambientales, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, convulsiones, temblores, estereotipias (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, movimientos anómalos de la cabeza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anómalos (por ejemplo, lamido excesivo o mordiscos, automutilación, marcha hacia atrás, vocalización) o de agresión.

26. Los signos de toxicidad han de anotarse, incluidos el día de inicio, la hora del día, el grado y la duración.

27. Los animales deben pesarse en el momento en que se les administra la sustancia, al menos una vez por semana a lo largo de todo el estudio, el día del parto o cerca de este, y el día DPN 21 (destete). En los ensayos en que se emplee la vía oral forzada, las madres deben pesarse como mínimo dos veces por semana. Las dosis deben adaptarse en el momento de cada determinación del peso corporal, según proceda. El consumo de alimentos debe medirse al menos una vez por semana durante la gestación y lactancia. Debe medirse el consumo de agua al menos semanalmente, si la exposición es a través del suministro de agua.

**Observaciones sobre los descendientes**

28. Todos los descendientes deben observarse cuidadosamente al menos una vez al día para detectar los signos de toxicidad y la morbimortalidad.

29. Durante los períodos de tratamiento y de observación, deben llevarse a cabo observaciones clínicas más detalladas de los descendientes. Los descendientes (al menos una cría/sexo/camada) serán observados por técnicos especializados que no estén advertidos del tratamiento de los animales, utilizando procedimientos normalizados para minimizar los sesgos y maximizar la fiabilidad entre los observadores. Cuando sea posible, se recomienda que las observaciones sean hechas por el mismo técnico. Como mínimo, deben supervisarse los parámetros descritos en los puntos 24 y 25 en la medida adecuada para la fase de desarrollo que se esté observando.

30. Han de anotarse todos los signos de toxicidad observados en los descendientes, incluidos el día de inicio, la hora del día, el grado y la duración.

**Parámetros físicos y del desarrollo**

31. Los cambios en los parámetros del desarrollo previos al destete (por ejemplo, despliegue de las orejas, apertura de los ojos, erupción de los incisivos) están muy correlacionados con el peso corporal (30)(31). El peso corporal puede ser el mejor indicador del desarrollo físico. La medición de parámetros del desarrollo se recomienda, por lo tanto, solo en el caso de que haya pruebas de que estos parámetros van a aportar información adicional. El calendario para la evaluación de estos parámetros se indica en el cuadro 1. En función de los efectos previstos y de los resultados de las mediciones iniciales, puede ser recomendable añadir puntos de medición adicionales o realizar las mediciones en otras fases del desarrollo.

▼M5

32. Es recomendable utilizar la edad post-coital en lugar de la edad postnatal al evaluar el desarrollo físico (33). Si se someten a ensayo las crías el día del destete, se recomienda hacerlo antes del destete en sí, para evitar un efecto de confusión debido al estrés asociado con el destete. Además, debe evitarse realizar cualquier ensayo con las crías durante los dos días siguientes al destete.

*Cuadro 1*

**Calendario de la evaluación de los parámetros físicos y del desarrollo, y de los parámetros funcionales/de comportamiento** ([a]).

| Períodos de edad / Parámetros | Antes del destete ([b]) | Antes de la madurez ([b]) | Adultos jóvenes ([b]) |
|---|---|---|---|
| **Parámetros físicos y del desarrollo** | | | |
| Peso corporal y observaciones clínicas | Semanalmente ([c]) | Al menos cada dos semanas | Al menos cada dos semanas |
| Peso del encéfalo | DPN 22 ([d]) | | En el momento del sacrifico |
| Neuropatología | DPN 22 ([d]) | | En el momento del sacrifico |
| Maduración sexual | — | Cuando corresponda | — |
| Otros parámetros del desarrollo ([e]) | Cuando corresponda | — | — |
| **Parámetros funcionales y de comportamiento** | | | |
| Ontogenia del comportamiento | Al menos dos mediciones | | |
| Actividad motriz (incluida la habituación) | 1–3 veces ([f]) | — | Una vez |
| Funciones motrices y sensitivas | — | Una vez | Una vez |
| Aprendizaje y memoria | — | Una vez | Una vez |

([a]) Este cuadro presenta el número mínimo de veces que se deben efectuar las mediciones. En función de los efectos previstos y de los resultados de las mediciones iniciales, puede ser recomendable añadir puntos de medición adicionales (por ejemplo, animales viejos) o realizar las mediciones en otras fases del desarrollo.

([b]) Se recomienda que las crías no se sometan a ensayo durante los dos días siguientes al destete (véase el punto 32). Las edades recomendadas para los ensayos con animales inmaduros son las siguientes: aprendizaje y memoria = DPN 25 ± 2; funciones motrices y sensitivas = DPN 25 ± 2. La edad recomendada para los ensayos con adultos jóvenes es DPN 60-70.

([c]) Los pesos corporales deben medirse al menos dos veces por semana cuando se administra la sustancia directamente a las crías, con el fin de ajustar las dosis en un período de rápido aumento del peso corporal.

([d]) El peso del encéfalo y la neuropatología pueden evaluarse en algún momento anterior (por ejemplo, DPN 11), cuando sea oportuno (véase el punto 39).

([e]) Deben registrarse cuando corresponda otros parámetros del desarrollo, además del peso corporal (por ejemplo, apertura de los ojos) (véase el punto 31).

([f]) Véase el punto 35.

33. Debe procederse al recuento de las crías vivas y a su asignación de sexo, por ejemplo por inspección visual o medición de la distancia anogenital (34)(35), y debe pesarse individualmente cada cría de una camada, al nacer o poco después, al menos una vez por semana a lo largo del período de lactancia, y posteriormente al menos una vez cada dos semanas. Al evaluar la madurez sexual, debe determinarse, al menos en un macho y una hembra por camada, la edad y el peso corporal del animal cuando se observe la permeabilidad vaginal (36) o la separación del prepucio (37).

▼M5

**Ontogenia del comportamiento**

34. La ontogenia de determinados comportamientos debe medirse al menos en una cría/sexo/camada durante el período de edad apropiado, utilizándose las mismas crías en todos los días de ensayo en relación con todos los comportamientos evaluados. Los días de medición debe estar espaciados uniformemente a lo largo de dicho período para determinar si el cambio en la ontogenia del comportamiento es normal o si está relacionado con el tratamiento (38). A continuación se indican ejemplos de comportamientos cuya ontogenia puede evaluarse: reflejo de enderezamiento, geotaxia negativa y actividad motriz (38)(39)(40).

**Actividad motriz**

35. La actividad motriz debe supervisarse (41)(42)(43)(44)(45) durante el período de edad anterior al destete y en la edad adulta. Sobre los ensayos en el momento del destete, véase el punto 32. La sesión de ensayo debe ser lo suficientemente larga para demostrar la habituación dentro de la sesión de los controles no tratados. Se recomienda encarecidamente utilizar la actividad motriz para evaluar la ontogenia del comportamiento. Si se utiliza como ensayo de la ontogenia del comportamiento, deben utilizarse los mismos animales en todas las sesiones de ensayo previas al destete. Las observaciones deben hacerse con la frecuencia suficiente para evaluar la ontogenia de la habituación dentro de cada sesión (44). De esta manera, puede ser necesario recurrir a tres o más momentos de observación hasta el día del destete, este incluido (por ejemplo, DPN 13, 17, 21). También deben examinarse los mismos animales, o los compañeros de camada, en la edad adulta, casi al final del estudio (por ejemplo, DPN 60-70). Podrán realizarse ensayos en días adicionales en caso necesario. La actividad motriz debe supervisarse con un aparato de registro automático de la actividad, que debe ser capaz de detectar tanto los aumentos como los descensos de esta (es decir, la actividad de referencia medida por el dispositivo no debe ser tan baja que no se puedan detectar los eventuales descensos, ni tan elevada que no se puedan detectar los eventuales aumentos de la actividad). Cada dispositivo debe comprobarse mediante procedimientos estándar para garantizar, en la medida de lo posible, la fiabilidad del funcionamiento con diferentes dispositivos y en diferentes días. En la medida de lo posible, los grupos tratados deben repartirse de forma equilibrada entre los distintos dispositivos. Cada animal debe ser objeto de ensayo por separado. Los grupos tratados deben equilibrarse en cuanto a los momentos del ensayo a fin de evitar confusiones debidas a los ritmos circadianos de actividad. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y no estén relacionadas sistemáticamente con el tratamiento. Entre las variables que pueden afectar a muchas mediciones del comportamiento, incluida la actividad motriz, están el nivel sonoro, el tamaño y la forma de las jaulas de ensayo, la temperatura, la humedad relativa, las condiciones de iluminación, los olores, el uso de las jaulas de alojamiento o de jaulas de ensayo distintas y las distracciones del entorno.

**Funciones motrices y sensitivas**

36. Las funciones motrices y sensitivas deben estudiarse detalladamente al menos una vez en el período previo a la madurez y una vez a lo largo del período de adultos jóvenes (por ejemplo, DPN 60-70). Sobre los ensayos en el momento del destete, véase el punto 32. Debe realizarse un número suficiente de ensayos a fin de garantizar un muestreo cuantitativo adecuado de modalidades sensitivas (por ejemplo, somatosensitiva, vestibular) y de funciones motrices (por ejemplo, fuerza, coordinación). Pueden citarse como ejemplos de ensayos de las funciones motrices y sensitivas los siguientes: reflejo de empuje extensor (46), reflejo de enderezamiento (47)(48), habituación al sobresalto acústico (40)(49)(50)(51)(52)(53)(54), y potenciales provocados (55).

▼M5

**Ensayos de aprendizaje y memoria**

37. Debe realizarse un ensayo de aprendizaje asociativo y memoria tras el destete (por ejemplo, 25 ± 2 días) y en el período de adultos jóvenes (DPN 60 y después). Sobre los ensayos en el momento del destete, véase el punto 32. En estas dos fases de desarrollo, pueden utilizarse los mismos ensayos u otros distintos. Se permite cierta flexibilidad en la elección de los ensayos de aprendizaje y memoria con ratas destetadas y adultas. Sin embargo, los ensayos deben concebirse de forma que cumplan dos criterios. En primer lugar, el aprendizaje debe evaluarse bien como un cambio en varias pruebas o sesiones de aprendizaje repetidas, o bien, en caso de ensayos que supongan una única prueba, con referencia a una condición de control de los efectos no asociativos de la experiencia de formación. En segundo lugar, los ensayos deben incluir alguna medida de la memoria (a corto o a largo plazo) además del aprendizaje original (adquisición), pero esta medida de la memoria no puede notificarse si se carece de una medida de la adquisición obtenida en el mismo ensayo. Si los ensayos de aprendizaje y memoria ponen de manifiesto la existencia de un efecto de la sustancia problema, puede considerarse la realización de ensayos adicionales para descartar las interpretaciones alternativas basadas en alteraciones de las capacidades sensitivas, motivacionales o motrices. Además de los dos criterios anteriores, se recomienda que el ensayo de aprendizaje y memoria se elija sobre la base de su sensibilidad probada para la clase de la sustancia problema, si se dispone de dicha información en la bibliografía. A falta de tal información, los siguientes son ejemplos de ensayos que podrían hacerse para cumplir los criterios citados: evitación pasiva (43)(56)(57), ajuste retrasado para la posición de las ratas adultas (58) y de las ratas lactantes (59), condicionamiento olfativo (43)(60), laberinto de agua de Morris (61)(62)(63), laberinto de Biel o Cincinnati (64)(65), laberinto de brazos radiales (66), laberinto en T (43), y adquisición y retención de comportamientos programados (26)(67)(68). En la bibliografía se encuentran descripciones de ensayos adicionales para ratas destetadas (26)(27) y ratas adultas (19)(20).

**Autopsia**

38. Los animales madre pueden sacrificarse después del destete de su descendencia.

39. La evaluación neuropatológica de la descendencia se efectuará utilizando los tejidos de los animales sacrificados de forma compasiva el DPN 22 o en un momento anterior, entre el DPN 11 y el DPN 22, así como al final del estudio. En el caso de los descendientes sacrificados hasta el DPN 22, deben evaluarse los tejidos del encéfalo; en el caso de los animales sacrificados al final del estudio, deben evaluarse los tejidos tanto del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico (SNP). Los tejidos de los animales sacrificados el DPN 22 o antes pueden fijarse por inmersión o por perfusión; los de los animales sacrificados al final del estudio deben fijarse por perfusión. Todos los aspectos de la preparación de las muestras de tejido, desde la perfusión de los animales hasta la disección de las muestras de tejido, el tratamiento de los tejidos y la tinción de las preparaciones microscópicas, deben seguir un diseño equilibrado de forma que cada lote contenga muestras representativas de cada grupo de dosis. En el documento de orientación nº 20 de la OCDE (9) se encuentran orientaciones adicionales; véase también (103).

**Tratamiento de las muestras de tejido**

40. Deben registrarse todas las anomalías macroscópicas visibles en el momento de la autopsia. Las muestras de tejidos tomadas deben representar todas las regiones principales del sistema nervioso. Las muestras de tejidos deben conservarse en un fijador adecuado y tratarse de acuerdo con protocolos histológicos publicados y normalizados (69)(70)(71)(103). La inclusión en parafina es aceptable para los tejidos del SNC y del SNP, pero puede ser apropiada la utilización de osmio tras la fijación, junto con la

▼M5

inclusión en epoxirresina, cuando se necesite un mayor grado de resolución (por ejemplo, para los nervios periféricos cuando se sospeche una neuropatía periférica, o para el análisis morfométrico de los nervios periféricos). Los tejidos del encéfalo recogidos para el análisis morfométrico deben incluirse en los medios apropiados al mismo tiempo para todos los niveles de dosis, a fin de evitar artefactos por retracción que pueden asociarse con una conservación prolongada en el fijador (6).

**Examen neuropatológico**

41. Los objetivos del examen cualitativo son los siguientes:

i) detectar las regiones del sistema nervioso que presentan indicios de alteraciones neuropatológicas;

ii) identificar los tipos de alteraciones neuropatológicas resultantes de la exposición a la sustancia problema; así como

iii) determinar el grado de gravedad de las alteraciones neuropatológicas.

Un anatomopatólogo con formación adecuada debe examinar al microscopio secciones histológicas representativas de las muestras de tejido para detectar los eventuales indicios de alteraciones neuropatológicas. A todas las alteraciones neuropatológicas se les debe asignar un grado subjetivo de gravedad. Una tinción con hematoxilina y eosina puede ser suficiente para evaluar las secciones del encéfalo de los animales sacrificados de forma compasiva el DPN 22 o antes. Sin embargo, se recomienda realizar una tinción de mielina (por ejemplo, azul de luxol rápido/violeta de cresilo) y una tinción de plata (por ejemplo, tinciones de Bielschowsky o de Bodian) para las secciones de tejidos del SNC y del SNP de los animales sacrificados al final del estudio. Según la opinión profesional del anatomopatólogo y el tipo de alteraciones observadas, pueden resultar adecuadas otras tinciones para identificar y caracterizar tipos concretos de alteraciones [por ejemplo, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o histoquímica de lectinas para evaluar las alteraciones de la glía y de la microglía (72), fluoro-jade para detectar necrosis (73)(74), o tinciones de plata específicas de la degeneración neuronal (75)].

42. Ha de efectuarse una evaluación morfométrica (cuantitativa), ya que estos datos pueden ayudar a la detección de un efecto relacionado con el tratamiento y son valiosos para la interpretación de las diferencias de peso o morfología del encéfalo relacionadas con el tratamiento (76)(77). Deben tomarse muestras de tejido nervioso, que han de prepararse para permitir las evaluaciones morfométricas. Entre estas se pueden incluir, por ejemplo, las mediciones lineales o superficiales de regiones específicas del encéfalo (78). Tales mediciones exigen la utilización de secciones homólogas, cuidadosamente seleccionadas en función de referencias microscópicas fiables (6). Puede utilizarse la estereología para identificar efectos relacionados con el tratamiento sobre parámetros tales como el volumen o el número de células de determinadas regiones neuroanatómicas (79)(80)(81)(82)(83)(84).

43. Debe examinarse el encéfalo para detectar los eventuales indicios de alteraciones neuropatológicas relacionadas con el tratamiento y deben tomarse muestras adecuadas de todas sus regiones principales (por ejemplo, bulbos olfativos, corteza cerebral, hipocampo, ganglios basales, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo (techo, tegmento y pedúnculos cerebrales), protuberancia, bulbo raquídeo, cerebelo) para garantizar un examen exhaustivo. Es importante que se tomen las secciones de todos los animales en el mismo plano. En el caso de los adultos sacrificados de forma compasiva al final del estudio, deben tomarse muestras de las secciones representativas de la médula espinal y del SNP. Las zonas examinadas deben incluir el ojo con el nervio óptico y la retina, la médula espinal en los engrosamientos cervical y lumbar, las fibras de las raíces anteriores y posteriores, el nervio ciático mayor proximal, el nervio ciático poplíteo interno proximal (en la rodilla) y las ramas del nervio ciático poplíteo interno que inervan los músculos de la pantorrilla. Las secciones de la médula espinal y de los nervios periféricos tienen que incluir tanto una sección transversal como una longitudinal.

▼M5

44. La evaluación neuropatológica debe incluir un examen para detectar eventuales signos de alteraciones del desarrollo del sistema nervioso (6)(85)(86)(87)(88)(89), además de alteraciones celulares (por ejemplo, vacuolización, degeneración o necrosis neuronal) y cambios histológicos (por ejemplo, gliosis, infiltración de leucocitos, formación de quistes). A este respecto, es importante que se distingan los efectos relacionados con el tratamiento de los acontecimientos normales del desarrollo que se sepa que se producen en una fase del desarrollo correspondiente al momento del sacrificio (90). Pueden citarse como ejemplos de alteraciones significativas que indican daño para el desarrollo las siguientes, sin ánimo de exhaustividad:

— alteraciones en el tamaño o la forma macroscópicos de los bulbos olfativos, el cerebro o el cerebelo;

— alteraciones en el tamaño relativo de las diversas regiones del encéfalo, como las disminuciones o aumentos del tamaño de regiones derivados de la pérdida o persistencia de poblaciones de células o proyecciones axónicas de carácter normalmente pasajero (por ejemplo, capa germinal externa del cerebelo, cuerpo calloso);

— alteraciones de la proliferación, migración y diferenciación, indicadas por zonas de necrosis o apoptosis excesivas, poblaciones agrupadas o dispersas de neuronas ectópicas, desorientadas o deformes, o alteraciones del tamaño relativo de diversos estratos de las estructuras corticales;

— alteraciones de las pautas de mielinización, como la reducción global del tamaño o la alteración de la tinción de las estructuras mielinizadas;

— signos de hidrocefalia, en particular la dilatación de los ventrículos, la estenosis del acueducto de Silvio y el adelgazamiento de los hemisferios cerebrales.

**Análisis de la relación dosis-respuesta de las alteraciones neuropatológicas**

45. Se recomienda seguir el siguiente procedimiento por fases para los análisis neuropatológicos cualitativos y cuantitativos. En primer lugar, se comparan las secciones del grupo de dosis alta con las del grupo de control. En caso de que no se detecten alteraciones neuropatológicas en los animales del grupo de dosis alta, no se requiere continuar el análisis. Si se encuentran indicios de alteraciones neuropatológicas en el grupo de dosis alta, se examinan los animales de los grupos de dosis intermedia y baja. Si el grupo de dosis alta se termina por causa de muerte o de otro tipo de toxicidad que implique confusión, deben analizarse los grupos de dosis alta e intermedia para detectar las eventuales alteraciones neuropatológicas. Si hay alguna indicación de neurotoxicidad en los grupos de la dosis inferior, debe realizarse con esos grupos el análisis neuropatológico. En caso de que en el examen cualitativo o cuantitativo se observen alteraciones neuropatológicas relacionadas con el tratamiento, deben determinarse la relación entre la dosis y la incidencia, y la frecuencia y el grado de gravedad de las lesiones o de las alteraciones morfométricas, sobre la base de una evaluación de todos los animales de todos los grupos de dosis. Deben incluirse en esta evaluación todas las regiones del encéfalo que presenten algún signo de alteración neuropatológica. Para cada tipo de lesión, deben describirse los criterios utilizados para definir los distintos grados de gravedad, indicando las características utilizadas para distinguir cada grado. Deben registrarse la frecuencia de cada tipo de lesión y su grado de gravedad, y debe realizarse un análisis estadístico para evaluar la naturaleza de la relación dosis-respuesta. Se recomienda el uso de preparaciones codificadas (91).

DATOS E INFORME

**Datos**

46. Los datos deben notificarse individualmente y resumirse en forma de cuadro, mostrándose para cada grupo de ensayo los tipos de cambio y el número de madres, de descendientes por sexo, y de camadas en las que se haya observado cada tipo de cambio. Si se ha utilizado la exposición postnatal directa de la descendencia, han de notificarse la vía, la duración y el período de la exposición.

▼M5

**Evaluación e interpretación de los resultados**

47. Un estudio de neurotoxicidad para el desarrollo debe proporcionar información sobre los efectos de la exposición continuada a una sustancia durante la vida intrauterina y en las primeras fases del desarrollo postnatal. Dado que el estudio se centra en parámetros tanto de toxicidad general como de neurotoxicidad para el desarrollo, los resultados deben permitir distinguir los efectos sobre el desarrollo neurológico que se producen en ausencia de toxicidad general para la madre frente a los que se manifiestan únicamente a dosis que también son tóxicas para la madre. Debido a la compleja interrelación entre el diseño del estudio, el análisis estadístico y la significación biológica de los datos, la interpretación adecuada de los datos de neurotoxicidad para el desarrollo implica el juicio de expertos (107)(109). Para la interpretación de los resultados del ensayo debe aplicarse un enfoque de ponderación de las pruebas (20)(92)(93)(94). Deben ser objeto de discusión las pautas de las eventuales observaciones conductuales o morfológicas, así como los datos sobre la relación dosis-respuesta. Deben incluirse en esta caracterización los datos de todos los estudios pertinentes para la evaluación de la neurotoxicidad para el desarrollo, incluidos los estudios epidemiológicos o los informes de casos humanos, y los estudios con animales de experimentación (por ejemplo, datos de toxicocinética, información sobre la relación estructura-actividad, datos de otros estudios de toxicidad). Esto incluye la relación entre las dosis de la sustancia problema y la presencia o ausencia, la incidencia y el alcance de cualesquiera efectos neurotóxicos para cada sexo (20)(95).

48. La evaluación de los datos debe incluir una discusión de la significación tanto biológica como estadística. El análisis estadístico debe considerarse como una herramienta que orienta para la interpretación de los datos, más que determinarla. La falta de significación estadística no debe ser el único motivo para concluir que no hay ningún efecto relacionado con el tratamiento, al igual que la presencia de significación estadística no puede ser la única justificación para concluir que se da algún efecto relacionado con el tratamiento. Para evitar posibles resultados negativos falsos y las dificultades inherentes a «comprobar un resultado negativo», deben discutirse los datos sobre los controles positivos e históricos disponibles, especialmente cuando no se observen efectos relacionados con el tratamiento (102)(106). La probabilidad de encontrar positivos falsos debe discutirse a la luz de la evaluación estadística total de los datos (96). La evaluación debe incluir la posible relación existente entre las alteraciones neuropatológicas y conductuales observadas.

49. Todos los resultados deben analizarse utilizando modelos estadísticos adecuados para el diseño experimental (108). La elección de un análisis paramétrico o no paramétrico debe justificarse teniendo en cuenta factores tales como la naturaleza de los datos (transformados o no) y su distribución, así como la relativa solidez de los análisis estadísticos seleccionados. El objetivo y el diseño del estudio deben guiar la elección del análisis estadístico para minimizar los errores de tipo I (positivos falsos) y de tipo II (negativos falsos) (96)(97)(104)(105). Los estudios sobre el desarrollo con especies multíparas en los que se estudian varias crías por camada deben incluir la camada en el modelo estadístico para evitar un aumento de los índices de errores de tipo I (98)(99)(100)(101). La unidad estadística de medida debe ser la camada y no la cría. Los experimentos deben diseñarse de manera que las crías de una misma camada no se traten como observaciones independientes. Cualquier parámetro medido varias veces en el mismo sujeto se analizará utilizando modelos estadísticos que tengan en cuenta el carácter no independiente de dichas medidas.

**Informe del ensayo**

50. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— naturaleza física y, si procede, propiedades fisicoquímicas;

— datos de identificación, incluido el origen;

▼M5

— pureza del preparado, e impurezas conocidas o previstas.

*Vehículo (si procede):*

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua o de la solución salina fisiológica.

*Animales de experimentación:*

— especie y cepa empleada, y justificación en caso de que sea distinta de la rata;

— proveedor de los animales de experimentación;

— número, edad al inicio del ensayo, y sexo de los animales;

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, agua, etc.;

— peso de cada animal al inicio del ensayo.

*Condiciones del ensayo:*

— justificación de la selección de las dosis;

— justificación de la vía y del período de administración;

— especificación de las dosis administradas, con datos sobre el vehículo, el volumen y la forma física del material administrado;

— datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado;

— método utilizado para la identificación inequívoca de las madres y de su descendencia;

— descripción detallada del procedimiento o procedimientos de aleatorización utilizados para asignar las madres a los grupos de tratamiento, para seleccionar las crías sobrantes que deben sacrificarse, y para asignar las crías a los grupos de ensayo;

— datos sobre la administración de la sustancia problema;

— conversión de la concentración (ppm) de la sustancia problema en los alimentos, en el agua de bebida o en el dispositivo de inhalación a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), en su caso;

— condiciones ambientales;

— datos de la calidad de los alimentos y del agua (por ejemplo, si es agua del grifo o destilada);

— fechas de inicio y terminación del estudio.

*Procedimientos de observación y ensayo:*

— descripción detallada de los procedimientos utilizados para normalizar las observaciones y procedimientos, así como definiciones operativas para asignar puntuación a las observaciones;

— lista de todos los procedimientos de ensayo utilizados y justificación de su empleo;

— datos de los procedimientos utilizados para los estudios conductuales/funcionales, anatomopatológicos, neuroquímicos o electrofisiológicos, con información y detalles sobre los dispositivos automáticos;

— procedimientos para calibrar y garantizar la equivalencia de los dispositivos y el equilibrio de los grupos de tratamiento en los procedimientos de ensayo;

— breve justificación de todas las decisiones que impliquen una opinión profesional.

▼M5

*Resultados (por separado y en resumen, incluidas la media y la varianza cuando proceda):*

— número de animales al comienzo del estudio y número al final del mismo;

— número de animales y de camadas utilizadas para cada ensayo;

— número de identificación de cada animal y camada de la que procede;

— tamaño de las camadas y peso medio al nacer por sexo;

— datos del peso corporal y de los cambios de este, incluido el peso corporal final de las madres y de su descendencia;

— datos sobre consumo de alimentos, y de agua si procede (por ejemplo, si la sustancia problema se administra con el agua);

— datos de reacciones tóxicas por sexo y dosis, incluidos los signos de toxicidad o mortalidad, con el momento y la causa de la muerte, si procede;

— naturaleza, gravedad, duración, día de inicio, hora del día, y evolución posterior de las observaciones clínicas detalladas;

— puntuación de cada parámetro del desarrollo (peso, maduración sexual y ontogenia del comportamiento) en cada momento de observación;

— descripción detallada de todas las observaciones conductuales, funcionales, neuropatológicas, neuroquímicas y electrofisiológicas por sexo, incluidos tanto los aumentos como los descensos respecto a los controles;

— observaciones de la autopsia;

— peso del encéfalo;

— eventuales diagnósticos derivados de lesiones y signos neurológicos, incluidas las enfermedades o procesos naturales;

— imágenes de observaciones modelo;

— imágenes de baja resolución para evaluar la homología de las secciones empleadas en relación con la morfometría;

— datos sobre la absorción y el metabolismo, incluidos los datos complementarios de un estudio toxicocinético aparte, si se dispone de ellos;

— tratamiento estadístico de los resultados, incluidos los modelos estadísticos utilizados para analizar los datos, y los resultados, con independencia de que sean significativos o no;

— lista del personal del estudio, incluida su formación profesional.

*Discusión de los resultados:*

— información sobre la relación dosis-respuesta, por sexo y grupo;

— relación de otros eventuales efectos tóxicos con la conclusión acerca del potencial neurotóxico de la sustancia problema, por sexo y grupo;

— impacto de cualquier información toxicocinética sobre las conclusiones;

— semejanzas con los efectos de cualquier neurotóxico conocido;

▼M5

— datos en apoyo de la fiabilidad y sensibilidad del método de ensayo (es decir, datos sobre controles positivos e históricos);

— eventual relación entre efectos neuropatológicos y funcionales;

— NOAEL o dosis de referencia para las madres y los descendientes, por sexo y grupo.

*Conclusiones:*

— discusión de la interpretación global de los datos sobre la base de los resultados, incluida la conclusión de si la sustancia problema ha provocado neurotoxicidad para el desarrollo y el NOAEL.

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhague, Dinamarca, 13-14 de junio de 1995.

(2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98-239. Disponible en la dirección: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].

(3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Disponible en la dirección: [http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?PrintVersion=True&deid=12479].

(4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. Environ. Health Perspect., 109:79-91.

(5) Dorman, D.C., Allen, SL, Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, SL, Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. Environ. Health Perspect., 109:101-111.

(6) Garman, R.H., Fix,A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. Environ. Health Perspect., 109:93-100.

(7) OCDE (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23-25 October 2000.

(8) OCDE (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OCDE, París. Julio de 2008. Disponible en la dirección: [http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(200816&doclanguage) = en].

(9) OCDE (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OCDE, París, septiembre de 2003. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/document/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].

(10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 12: 173-292.

(11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition,* ISBN 0195084772, Oxford University Press, Nueva York.

▼**M5**

(12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 8:188-197.

(13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition,* ISBN 0126488606, Academic Press, New York.

(14) Capítulo B.34 del presente anexo, Ensayo de reproducción en una generación.

(15) Capítulo B.35 del presente anexo, Estudio de toxicidad para la reproducción en dos generaciones.

(16) Capítulo B.43 del presente anexo, Estudio de neurotoxicidad en roedores.

(17) Capítulo B.31 del presente anexo, Estudio de toxicidad para el desarrollo prenatal.

(18) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.

(19) OMS (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals,* (Environmental Health Criteria 60), Albany, Nueva York: Centro de Publicaciones de la Organización Mundial de la Salud, Estados Unidos de América. Disponible en la dirección: [http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm].

(20) OMS (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches,* (Environmental Health Criteria 223), Publicaciones de la Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Disponible en la dirección: [http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm].

(21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition,* ISBN 012168055X, Academic Press, Nueva York.

(22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 19:499-509.

(23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. Fundam. Appl. Toxicol., 38:2-6.

(24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. Lab. Animal Sci., 27:110-112.

(25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. Fundam. Appl. Toxicol., 13:118-136.

(26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory.* ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, Nueva Jersey.

(27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective.* Academic Press, Orlando.

(28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research.* ILSI Press, Washington, DC.

(29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. Int. J. Toxicol., 24:87-94.

(30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. Toxicol. Sci., 49: 1-4.

(31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Phamaceuticals for Human Use.

(32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. J. Am. Coll. Toxicol., 6:433-439.

▼**M5**

(33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 20:449-457.

(34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. Reprod. Toxicol., 13:383-390.

(35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. Toxicol. Sci., 58:350-365.

(36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:579-586.

(37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. Biol. Reprod., 17:298-303.

(38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 12:489-95.

(39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. Anim. Behav., 23:896-920.

(40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. En: *Handbook of Behavioral Teratology.* Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, Nueva York, pp. 67-100.

(41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. Neurobehav. Toxicol., 1:53-66.

(42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology,* Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, Nueva York, pp. 37-82.

(43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3′-iminodipropionitrile in the rat. Neurotoxicol. Teratol., 15:117-129.

(44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. Dev. Psychobiol., 18:247-260.

(45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13:599-609.

(46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 19:1997. 405-411.

(47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals.Physiol. Behav., 64:661-669.

(48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol. Appl. Pharmacol., 40:589-591.

(49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. En: *Neural Mechanisms of Startle Behavior,* Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, Nueva York, pp. 287-351

(50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. Prog. Neurobiol., 59:107-128.

(51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology,* Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, Nueva York, pp. 181-211.

▼**M5**

(52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. J. Am. Coll. Toxicol., 8:199-211.

(53) Crofton, K.M, Lassiter, T.L, Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. Hear. Res.,80:25-30.

(54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 6:437–445.

(55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. En: *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity,* Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, Nueva York. pp. 125-145.

(56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3′-iminopropionitrile. Toxicol. Appl. Pharmacol., 105:321-332.

(57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. Neurosci. Behav. Rev., 6:247-296.

(58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. Neurotoxicol. Teratol., 10:237-244.

(59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. Behav. Neurosci., 103:98-105.

(60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. Develop. Psychobiol., 17:465-479.

(61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J. Neurosci. Methods, 11:47-60.

(62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. Int. J. Neurosci., 48:29-69.

(63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Res. Rev, 36:60-90.

(64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. Neurotoxicol. Teratol., 9:235-241.

(65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. Drug Chem. Toxicol., 20:387-399.

(66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. Neurotoxicol. Teratol., 10:327-332.

(67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. Toxicol. Appl. Pharmacol., 71:342-352.

(68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. J. Gerontol., 36:338–341.

(69) Fix, A.S, Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. Toxicol. Pathol., 28: 122-131.

(70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology,* American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84-107.

(71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques,* 5th edition, Churchill Livingstone, Londres.

▼**M5**

(72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. Toxicol. Pathol., 24: 291-304.

(73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. Brain Res., 874:123-130.

(74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. Exp. Toxic. Pathol., 53:365-372.

(75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. Neurotoxicol. Teratol., 16, 545-561.

(76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. Environ. Toxicol. Pharmacol., 19:745-755.

(77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. Reprod. Toxicol., 20:417-432.

(78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. Neurobehav. Toxicol., 1:129–135.

(79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy,* Springer-Verlag, New York.

(80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 57: 305-310.

(81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. Brain Res., 609: 262-268.

(82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. J. Neurocytol., 26:707-710.

(83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. Trends Neurosci., 22:51-61.

(84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. Neuroscience, 130: 813–831.

(85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). Teratology, 49:113-121.

(86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. Develop. Brain Res., 84:294-298.

(87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. En: *Handbook of Developmental Neurotoxicology,* Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, Nueva York, pp. 3-41.

(88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovska, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science, 283:70-74.

▼**M5**

(89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. Science, 287:1056–1060.

(90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology.* Segunda edición. Springer-Verlag, Berlín.

(91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. Toxicol. Let., 63:127-133.

(92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure estándares: a decision process. Environ. Health Perspect., 104:401-405.

(93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644A.

(94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.

(95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology.* Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.

(96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. Neurotoxicology, 5:113-126.

(97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. J. Am. Coll. Toxicol., 8:21-27.

(98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. Dev. Psychobiol., 6:329-335.

(99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. Teratology, 12:165-172.

(100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. Neurotoxicol. Teratol., 14: 221-228.

(101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. Neurobehav. Toxicol. Teratol., 7:587-90.

(102) Crofton, K.M., Makris, SL, Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. Neurotoxicol. Teratol., 26:345-352.

(103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A 'best practices' approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing for today. Toxicol. Pathol. 34:296-313.

(104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. Neurotoxicol. Teratol., 14(3):205-210.

(105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. Biometrics, 41:295-301.

(106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):266-287.

(107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):288-325.

▼**M5**

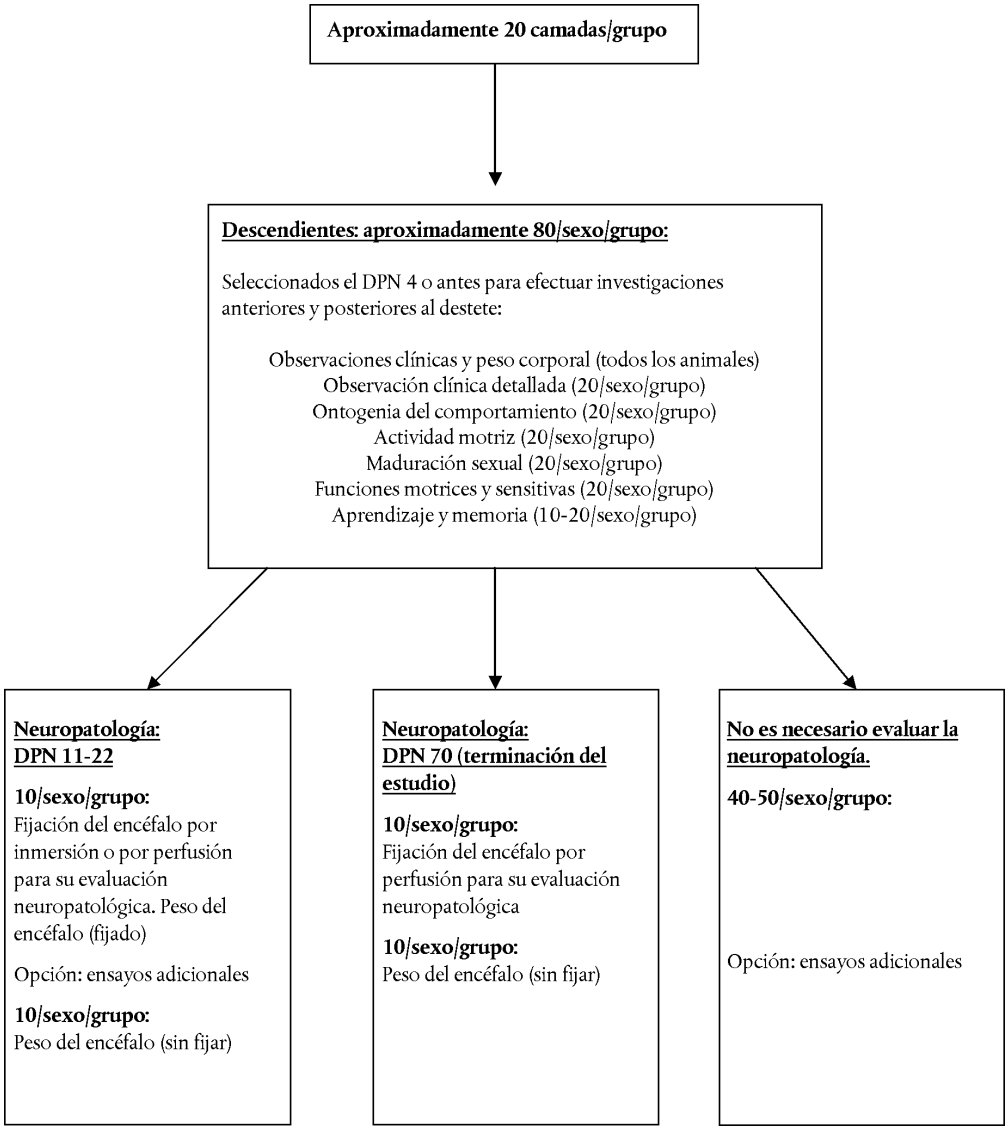
(108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):326-348.

(109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints *Neurotoxicology and Teratology,* 30(4):349-381.

▼M5

*Figura 1*

**Esquema general de los ensayos funcionales/conductuales, de evaluación neuropatológica y de pesaje del encéfalo. Este diagrama se basa en la descripción recogida en los puntos 13-15 (DPN = día postnatal). En el apéndice 1 se recogen ejemplos de asignación de los animales**



▼**M5**

*Apéndice 1*

1. A continuación se describen ejemplos de posibles asignaciones y se recogen en cuadros. Estos ejemplos se adjuntan para ilustrar que la asignación de los animales de experimentación a los distintos paradigmas de ensayo puede llevarse a cabo de varias maneras.

**Ejemplo 1**

2. Para los ensayos de ontogenia del comportamiento anteriores al destete se utiliza un conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De estos animales, 10 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se sacrifican de forma compasiva el día DPN 22. Se retira el encéfalo, se pesa y se prepara para su evaluación histopatológica. Por otra parte, se recogen los datos del peso de los encéfalos sin fijar de los 10 machos y 10 hembras restantes por dosis.

3. Para los ensayos funcionales/conductuales posteriores al destete (observaciones clínicas detalladas, actividad motriz, sobresalto acústico y ensayo de la función cognitiva en el período previo a la madurez) y para evaluar la edad de la maduración sexual, se utiliza otro conjunto de 20 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, 10 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se anestesian y se fijan por perfusión al finalizar el estudio (alrededor del día DPN 70). Previa fijación adicional *in situ,* se retira el encéfalo y se prepara para su evaluación neuropatológica.

4. Para el ensayo de la función cognitiva en adultos jóvenes (por ejemplo, DPN 60-70), se utiliza un tercer conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, se sacrifican al final del estudio 10 animales/sexo/grupo (1 macho o 1 hembra por camada), y se retira y pesa su encéfalo.

5. Los restantes 20 animales/sexo/grupo se reservan para eventuales ensayos adicionales.

*Cuadro 1*

| Cría nº (a) | | Nº de crías asignado al ensayo | Examen/ensayo |
|---|---|---|---|
| m | h | | |
| 1 | 5 | 20 m + 20 h | Ontogenia del comportamiento |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría DPN 22 |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo DPN 22 |
| 2 | 6 | 20 m + 20 h | Observaciones clínicas detalladas |
| | | 20 m + 20 h | Actividad motriz |
| | | 20 m + 20 h | Maduración sexual |
| | | 20 m + 20 h | Funciones motrices y sensitivas |
| | | 20 m + 20 h | Aprendizaje y memoria (DPN 25) |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría de adultos jóvenes ~DPN 70 |

▼**M5**

| Cría nº (a) | | Nº de crías asignado al ensayo | Examen/ensayo |
|---|---|---|---|
| m | h | | |
| 3 | 7 | 20 m + 20 h | Aprendizaje y memoria (adultos jóvenes) |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo de adultos jóvenes ~DPN 70 |
| 4 | 8 | — | Animales de reserva para sustituciones o ensayos adicionales |

(a) Para este ejemplo, se sacrifican los animales sobrantes de las camadas para dejar 4 machos + 4 hembras; las crías macho se numeran del 1 al 4, y las hembras del 5 al 8.

**Ejemplo 2**

6. Para los ensayos de ontogenia del comportamiento anteriores al destete se utiliza un conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De estos animales, 10 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se sacrifican de forma compasiva el día DPN 11. Se retira el encéfalo, se pesa y se prepara para su evaluación histopatológica.

7. Para los ensayos posteriores al destete (observaciones clínicas detalladas, actividad motriz, evaluación de la edad de la maduración sexual y funciones motrices y sensitivas) se utiliza otro conjunto de 20 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, 10 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se anestesian y se fijan por perfusión al finalizar el estudio (alrededor del día DPN 70). Previa fijación adicional *in situ,* se retira el encéfalo, se pesa y se prepara para su evaluación neuropatológica.

8. Para el ensayo de la función cognitiva en el período previo a la madurez y en adultos jóvenes, se utilizan 10 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada). Se utilizan animales distintos para los ensayos de la función cognitiva realizados el día DPN 23 y para los realizados con adultos jóvenes. Al finalizar el estudio, se sacrifican 10 animales/sexo/grupo de entre los utilizados para el ensayo con adultos, se retira el encéfalo y se pesa.

9. Los 20 animales/sexo/grupo restantes que no se han seleccionado para los ensayos se eliminan al destete.

*Cuadro 2*

| Cría nº (a) | | Nº de crías asignado al ensayo | Examen/ensayo |
|---|---|---|---|
| m | h | | |
| 1 | 5 | 20 m + 20 h | Ontogenia del comportamiento |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría DPN 11 |
| 2 | 6 | 20 m + 20 h | Observaciones clínicas detalladas |
| | | 20 m + 20 h | Actividad motriz |
| | | 20 m + 20 h | Maduración sexual |
| | | 20 m + 20 h | Funciones motrices y sensitivas |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría de adultos jóvenes ~DPN 70 |

▼**M5**

| Cría nº (a) | | Nº de crías asignado al ensayo | Examen/ensayo |
|---|---|---|---|
| m | h | | |
| 3 | 7 | 10 m + 10 h (b) | Aprendizaje y memoria (DPN 23) |
| 3 | 7 | 10 m + 10 h (b) | Aprendizaje y memoria (adultos jóvenes)<br>Pesaje del encéfalo de adultos jóvenes |
| 4 | 8 | — | Animales sacrificados y desechados el día DPN 21 |

(a) Para este ejemplo, se sacrifican los animales sobrantes de las camadas para dejar 4 machos + 4 hembras; las crías macho se numeran del 1 al 4, y las hembras del 5 al 8.

(b) Se utilizan crías diferentes para los ensayos de la función cognitiva realizados el día DPN 23 y para los realizados con adultos jóvenes (por ejemplo, de las camadas pares/impares del total de 20).

**Ejemplo 3**

10. Para el pesaje del encéfalo y la evaluación de la neuropatología del día DPN 11 se utiliza un conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De estos animales, 10 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se sacrifican de forma compasiva el día DPN 11, y se les retira el encéfalo, que se pesa y se prepara para su evaluación histopatológica. Por otra parte, se recogen los datos del peso de los encéfalos sin fijarde los 10 machos y 10 hembras restantes por cada dosis.

11. Para los ensayos de ontogenia del comportamiento (actividad motriz), los exámenes posteriores al destete (actividad motriz y evaluación de la edad de la maduración sexual), y el ensayo de la función cognitiva en el período previo a la madurez, se utiliza otro conjunto de 20 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada).

12. Para los ensayos de las funciones motrices y sensitivas (sobresalto acústico) y las observaciones clínicas detalladas, se utiliza otro conjunto de 20 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, 10 animales/sexo/dosis (es decir, 1 macho o 1 hembra por camada) se anestesian y se fijan por perfusión al finalizar el estudio (alrededor del día DPN 70). Previa fijación adicional *in situ,* se retira el encéfalo, se pesa y se prepara para su evaluación neuropatológica.

13. Para el ensayo de la función cognitiva en adultos jóvenes, se utiliza otro conjunto de 20 crías/sexo/dosis (es decir, 1 macho y 1 hembra por camada). De este conjunto, se sacrifican al final del estudio 10 animales/sexo/grupo (1 macho o 1 hembra por camada), y se retira y pesa su encéfalo.

*Cuadro 3*

| Cría nº (a) | | Nº de crías asignado al ensayo | Examen/ensayo |
|---|---|---|---|
| m | h | | |
| 1 | 5 | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría DPN 11 |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo DPN 11 |
| 2 | 6 | 20 m + 20 h | Ontogenia del comportamiento (actividad motriz) |
| | | 20 m + 20 h | Actividad motriz |
| | | 20 m + 20 h | Maduración sexual |
| | | 20 m + 20 h | Aprendizaje y memoria (DPN 27) |

▼**M5**

| Cría nº (a) | | Nº de crías asignado al ensayo | Examen/ensayo |
|---|---|---|---|
| m | h | | |
| 3 | 7 | 20 m + 20 h | Sobresalto acústico (período previo a la madurez y adultos jóvenes) |
| | | 20 m + 20 h | Observaciones clínicas detalladas |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo/neuropatología/morfometría de adultos jóvenes ~DPN 70 |
| 4 | 8 | 20 m + 20 h | Aprendizaje y memoria (adultos jóvenes) |
| | | 10 m + 10 h | Pesaje del encéfalo de adultos jóvenes |

(a) Para este ejemplo, se sacrifican los animales sobrantes de las camadas para dejar 4 machos + 4 hembras; las crías macho se numeran del 1 al 4, y las hembras del 5 al 8.

▼**M5**

*Apéndice 2*

**Definiciones**

Sustancia: Sustancia o mezcla

Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M5

## B.54. BIOENSAYO UTEROTRÓFICO CON ROEDORES: ENSAYO DE CRIBADO A CORTO PLAZO DE LAS PROPIEDADES ESTROGÉNICAS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 440 (2007). La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos de cribado y finales de posibles alteradores endocrinos (1). Uno de los elementos de la actividad consistía en elaborar unas directrices para el bioensayo uterotrófico con roedores. El bioensayo uterotrófico con roedores se sometió entonces a un completo programa de validación, con la recopilación de un detallado documento de referencia (2)(3) y la realización de unos amplios estudios intra e interlaboratorios para demostrar la pertinencia y la reproducibilidad del bioensayo con un potente estrógeno de referencia, con agonistas débiles de los receptores estrogénicos, con un antagonista fuerte de los receptores estrogénicos, y con una sustancia de referencia negativa (4)(5)(6)(7)(8)(9). El presente método B.54 se basa en la experiencia obtenida con el programa de validación del ensayo y en los resultados conseguidos de esta manera con agonistas estrogénicos.

2. El bioensayo uterotrófico es un ensayo de cribado a corto plazo cuyo origen data de la década de 1930 (27)(28) y fue normalizado por primera vez con este carácter por un comité de expertos en 1962 (32)(35). Se basa en el aumento del peso del útero o respuesta uterotrófica (véase una revisión en la referencia 29). Evalúa la posibilidad de que una sustancia provoque actividades biológicas que concuerden con las de agonistas o antagonistas de los estrógenos naturales (por ejemplo, el 17ß-estradiol); sin embargo, su uso para detectar efectos antagonistas es mucho menos frecuente que para detectar efectos agonistas. El útero responde a los estrógenos de dos maneras. Una primera respuesta es el aumento de peso debido a la imbibición de agua. Esta respuesta va seguida de un aumento de peso debido al crecimiento tisular (30). Las respuestas del útero en ratas y ratonas son comparables cualitativamente.

3. Este bioensayo sirve de ensayo de cribado *in vivo* y su aplicación debe considerarse en el contexto del 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos) (apéndice 2). En este marco conceptual el bioensayo uterotrófico figura en el nivel 3 como ensayo *in vivo* que proporciona datos sobre un solo mecanismo endocrino, a saber, la estrogenicidad.

4. Se pretende incluir el bioensayo uterotrófico en una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* para identificar las sustancias con potencial para interactuar con el sistema endocrino, lo que desembocará finalmente en evaluaciones del riesgo para la salud humana o el medio ambiente. El programa de validación de la OCDE ha utilizado agonistas estrogénicos tanto fuertes como débiles, a fin de evaluar el comportamiento del ensayo en cuanto a la detección de sustancias estrogénicas (4)(5)(6)(7)(8). De este modo, se ha demostrado bien la sensibilidad del procedimiento de ensayo para los agonistas estrogénicos, además de una buena reproducibilidad intra e interlaboratorios.

5. Por lo que se refiere a sustancias negativas, se incluyó en el programa de validación una única sustancia «negativa» de referencia que ya se había considerado negativa en el ensayo uterotrófico, así como en ensayos *in vitro* de receptores y de unión a receptores, pero se han evaluado datos adicionales del ensayo, no relacionados con el programa de validación de la OCDE, que refuerzan el apoyo a la especificidad del bioensayo uterotrófico para el cribado de agonistas estrogénicos (16).

▼**M5**

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

6. Los agonistas y antagonistas estrogénicos actúan como ligandos de los receptores estrogénicos α y b, y pueden activar o inhibir, respectivamente, la acción transcripcional de los receptores. Esto podría provocar peligros para la salud, incluidos ciertos efectos sobre la reproducción y el desarrollo. Por lo tanto, es necesario evaluar con rapidez las sustancias como posibles agonistas o antagonistas estrogénicos. Aunque de carácter informativo, la afinidad de un ligando por un receptor estrogénico o la activación transcripcional de genes marcadores *in vitro* son solo uno de los varios factores determinantes de un posible peligro. Otros factores determinantes pueden ser la activación y la desactivación metabólica de la sustancia al entrar en el organismo, su distribución en los tejidos diana, y la eliminación del organismo, que dependen, al menos en parte, de la vía de administración y de la sustancia estudiada. Esto conduce a la necesidad de detectar la posible actividad de una sustancia *in vivo* en condiciones pertinentes, salvo que las características de la sustancia en relación con su absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) ya aporten la información adecuada. Los tejidos uterinos responden con un crecimiento rápido y vigoroso al estímulo de los estrógenos, especialmente en el caso de los roedores de laboratorio, en los que el ciclo estral dura unos 4 días. Diversas especies de roedores, en particular la rata, se utilizan también ampliamente en estudios de toxicidad para la caracterización de los peligros. Por lo tanto, el útero de los roedores es un órgano diana adecuado para el ensayo de cribado *in vivo* de los agonistas y antagonistas estrogénicos.

7. El presente método de ensayo se basa en los protocolos empleados en el estudio de validación de la OCDE que han demostrado ser fiables y repetibles en estudios intra e interlaboratorios (5)(7). Actualmente se dispone de dos métodos, a saber, el de hembras adultas ovariectomizadas (método de las adultas ovx) y el de hembras inmaduras no ovariectomizadas (método de las inmaduras). En el programa de validación de ensayos de la OCDE se ha demostrado que estos métodos presentan una sensibilidad y una reproducibilidad comparables. Sin embargo, el método de las hembras inmaduras, por tener estas intacto el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG), es en cierto modo menos específico, pero abarca un ámbito de investigación más amplio que el método de las hembras ovariectomizadas, ya que puede responder a las sustancias que interactúan con el eje HPG y no tan solo con el receptor estrogénico. El eje HPG de la rata es funcional a los 15 días de edad, aproximadamente. Antes de ese momento, no es posible acelerar la pubertad con tratamientos tales como la administración de la hormona liberadora de gonadotropina (Gn-RH). Cuando las hembras comienzan a alcanzar la pubertad, antes de la apertura vaginal, la hembra tiene varios ciclos silenciosos que no dan lugar a la apertura de la vagina ni a la ovulación, pero sí a algunas fluctuaciones hormonales. Si una sustancia estimula entonces directa o indirectamente el eje HPG, puede provocar una pubertad precoz, una ovulación precoz y una apertura vaginal acelerada. No solo las sustancias que actúan sobre el eje HPG tienen este efecto, sino que algunas dietas con niveles de energía metabolizable más altos que otras pueden estimular el crecimiento y acelerar la apertura de la vagina sin ser de efecto estrogénico. Tales sustancias no inducen una respuesta uterotrófica en animales adultos ovx ya que el eje HPG de estos no funciona.

8. Por razones de bienestar de los animales debe darse preferencia al método que utiliza ratas inmaduras, evitando así el pretratamiento quirúrgico de los animales y también el riesgo de no poder utilizar los animales que muestren algún signo de inicio del ciclo estral (véase el punto 30).

▼**M5**

9. La respuesta uterotrófica no es totalmente de origen estrogénico, es decir, es posible que la produzcan otras sustancias, distintas de los agonistas o antagonistas estrogénicos. Por ejemplo, pueden dar lugar a esta respuesta dosis relativamente altas de progesterona, de testosterona, o de diversas progestinas sintéticas (30). Las eventuales respuestas pueden analizarse histológicamente para detectar la posible queratinización de la vagina (30). Independientemente del posible origen de la respuesta, un resultado positivo en un bioensayo uterotrófico debería lanzar en principio el procedimiento para aclarar la situación. Pueden obtenerse pruebas adicionales de estrogenicidad mediante ensayos *in vitro,* tales como el ensayo de unión a receptores estrogénicos y el ensayo de activación transcripcional, o mediante otros ensayos *in vivo* tales como el ensayo sobre la pubertad con hembras.

10. Teniendo en cuenta que el bioensayo uterotrófico sirve de ensayo de cribado *in vivo,* el enfoque de validación adoptado ha tenido en cuenta tanto el bienestar de los animales como la configuración de una estrategia de ensayos secuencial. Con este fin, el esfuerzo se ha dirigido a la validación rigurosa de la reproducibilidad y de la sensibilidad en cuanto a la estrogenicidad, que es la principal preocupación relativa a muchas sustancias, pero se ha insistido poco en cuanto al componente antiestrogénico del ensayo. Solo se ha sometido a ensayo un antiestrógeno con actividad fuerte, ya que es muy limitado el número de sustancias con un perfil antiestrogénico claro (sin interferencias por alguna actividad estrogénica). Por lo tanto, el presente método de ensayo está dedicado al protocolo estrogénico, mientras que el protocolo que describe el modo del ensayo de antagonistas se incluye en un documento de orientación (37). La reproducibilidad y la sensibilidad del ensayo para sustancias con actividad puramente antiestrogénica se definirán después de manera más clara, un vez que se haya utilizado sistemáticamente el procedimiento de ensayo durante algún tiempo y se hayan detectado más sustancias con esta modalidad de acción.

11. Se acepta que todos los procedimientos en los que se utilicen animales se atendrán a las normas locales de tratamiento de animales; las descripciones de tratamiento y atención de animales recogidas más adelante constituyen los requisitos mínimos de comportamiento, y quedarán anuladas por las normas locales, tales como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (38). La OCDE proporciona más orientaciones sobre el tratamiento compasivo de los animales (25).

12. Como con todos los ensayos en que se utilicen animales vivos, es esencial asegurarse de que los datos son realmente necesarios antes del inicio del ensayo. Por ejemplo, dos situaciones en que puede cumplirse esta condición son las siguientes:

— una elevada exposición potencial (nivel 1 del marco conceptual, apéndice 2) o indicios de estrogenicidad (nivel 2), a fin de analizar si estos efectos pueden producirse *in vivo;*

— efectos indicadores de estrogenicidad en ensayos *in vivo* de nivel 4 o 5, para justificar que los efectos se referían a un mecanismo estrogénico que no puede dilucidarse utilizando un ensayo *in vitro.*

13. Las definiciones utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

▼M5

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. El bioensayo uterotrófico basa su sensibilidad en un sistema de ensayo con animales en los que el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios no está funcional, lo que provoca que los niveles endógenos de estrógenos circulantes sean bajos. De esta manera se garantiza que el peso uterino de referencia sea bajo y que se obtenga una banda máxima de respuesta a los estrógenos administrados. En las hembras de los roedores se dan dos situaciones de sensibilidad a los estrógenos que cumplen este requisito:

i) hembras inmaduras tras el destete y antes de la pubertad, y

ii) hembras adultas jóvenes después de la ovariectomía, con tiempo suficiente para que retrocedan los tejidos uterinos.

15. La sustancia problema se administra diariamente por vía oral forzada o inyección subcutánea. Se administran dosis graduadas de la sustancia problema a un mínimo de dos grupos de tratamiento (véase el punto 33 al respecto) de animales de experimentación, utilizando un solo nivel de dosis por grupo, con un período de administración de tres días consecutivos en el método de hembras inmaduras y un período mínimo de administración de tres días consecutivos en el método de las hembras adultas ovx. Tras unas 24 h después de la administración de la última dosis se procede a realizar la autopsia de los animales. Para detectar los agonistas estrogénicos, se evalúa la media del peso del útero de los grupos de animales tratados con la sustancia problema, comparando con el grupo al que se ha administrado solo el vehículo, atendiendo a un posible aumento estadísticamente significativo. Un aumento estadísticamente significativo de la media del peso del útero de un grupo de ensayo indica una respuesta positiva en este bioensayo.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

16. Pueden utilizarse cepas de roedores de uso común en laboratorios. A modo de ejemplo, durante la validación se han utilizado las cepas de ratas Sprague-Dawley y Wistar. No deben utilizarse cepas de cuyos úteros se sepa o se sospeche que son menos sensibles. El laboratorio debe demostrar la sensibilidad de la cepa utilizada, según se describe en los puntos 26 y 27.

17. Las ratas y los ratones son especies utilizadas sistemáticamente en el bioensayo uterotrófico desde la década de 1930. Los estudios de validación de la OCDE solo se han realizado con ratas, ya que se piensa que estas especies son equivalentes y, por lo tanto, debe ser suficiente una sola especie para la validación a escala mundial, con el fin de ahorrar recursos y animales. La rata es la especie elegida en la mayoría de los estudios de toxicidad para la reproducción y el desarrollo. Teniendo en cuenta que existe una gran base de datos históricos sobre los ratones y para ampliar el ámbito de aplicación del método del bioensayo uterotrófico en roedores al uso de ratones como especie de ensayo, se ha realizado un estudio limitado de validación complementaria con ratones (16). Se ha seleccionado un enfoque comparativo con un número limitado de sustancias problema y de laboratorios participantes, y sin muestras codificadas, de acuerdo con la intención original de ahorrar recursos y animales. Este estudio de validación comparativo para el bioensayo uterotrófico en ratonas adultas jóvenes ovariectomizadas muestra que los datos obtenidos en ratas y ratones se corresponden bien, tanto cualitativa como cuantitativamente. Cuando el resultado del bioensayo uterotrófico pueda ser un dato preliminar para un estudio a largo plazo, se permitirá que se utilicen en ambos estudios los animales de la misma cepa y del mismo origen. El enfoque comparativo se limita a las ratonas ovx y el informe no aporta un conjunto sólido de datos para validar el modelo con hembras inmaduras, por lo que no se considera que el modelo con animales inmaduros quede incluido, en el caso de los ratones, en el ámbito de aplicación del presente método de ensayo.

▼M5

18. Por lo tanto, en algunos casos es posible utilizar ratones en lugar de ratas. Debe darse una justificación si se usa esta especie, basada en estudios toxicológicos o farmacocinéticos o en otros criterios. Es posible que resulte necesario modificar el protocolo en el caso de los ratones. Por ejemplo, el consumo de alimentos de los ratones por unidad de peso corporal es más elevado que el de las ratas y, por lo tanto, el contenido de fitoestrógenos en los alimentos deberá ser menor en el caso de los ratones que en el de las ratas (9)(20)(22).

**Condiciones de alojamiento y alimentación**

19. Todos los procedimientos deben atenerse a las normas locales de tratamiento de animales de laboratorio. Estas descripciones de tratamiento y atención de animales constituyen los requisitos mínimos, y quedarán anuladas por las normas locales, tales como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (38). El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (con una oscilación máxima aproximada de ± 3 °C). La humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y de preferencia no exceder del 70 %, salvo durante la limpieza del local. El objetivo debe ser conseguir una humedad relativa del 50-60 %. La iluminación debe ser artificial. La secuencia diaria de iluminación debe ser de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

20. Debe darse una dieta de laboratorio y agua de bebida *ad libitum.* Los animales adultos jóvenes pueden estar en jaulas individuales o bien en grupos de hasta tres animales. Debido a la corta edad de los animales inmaduros, se recomienda su alojamiento en grupos sociales.

21. Se sabe que un alto nivel de fitoestrógenos en las dietas de laboratorio hace aumentar el peso del útero de los roedores en un grado suficiente para interferir con el bioensayo uterotrófico (13)(14)(15). Unos niveles elevados de fitoestrógenos y de energía metabolizable en las dietas de laboratorio pueden dar lugar también a una pubertad precoz en animales inmaduros, si son estos los utilizados. La presencia de fitoestrógenos procede fundamentalmente de la inclusión de productos de soja y de alfalfa en las dietas de laboratorio, y se ha demostrado que las concentraciones de fitoestrógenos varían de un lote a otro en las dietas normales de laboratorio (23). El peso corporal es una variable importante, puesto que la cantidad de alimentos consumidos está relacionada con el peso corporal. Por consiguiente, la dosis realmente consumida de fitoestrógenos procedentes de la misma dieta puede variar según la especie y la edad (9). En el caso de las ratas hembras inmaduras, el consumo de alimentos por unidad de peso corporal puede ser aproximadamente el doble que en el de hembras adultas jóvenes ovariectomizadas. En el caso de las ratonas adultas jóvenes, el consumo de alimentos por unidad de peso corporal puede ser aproximadamente el cuádruple que en el de ratas adultas jóvenes ovariectomizadas.

22. Sin embargo, los resultados del bioensayo uterotrófico (9)(17)(18)(19) indican que la presencia de cantidades limitadas de fitoestrógenos en la dieta es aceptable y no reduce la sensibilidad del bioensayo. Como orientación, los niveles alimentarios de fitoestrógenos no deben superar los 350 μg de equivalentes de genisteína/gramo de dieta de laboratorio en el caso de las ratas hembras inmaduras de las cepas Sprague Dawley y Wistar (6)(9). Estas dietas deben ser apropiadas también cuando se someten a ensayo las ratas adultas jóvenes ovariectomizadas porque el consumo de alimentos por unidad de peso corporal es menor en adultos jóvenes que en animales inmaduros. Si se van a utilizar ratonas adultas ovariectomizadas o ratas más sensibles a los fitoestrógenos, debe considerarse una reducción proporcional en los niveles de fitoestrógenos de la dieta (20). Además, las diferencias en la energía metabólica disponible de las distintas dietas puede provocar cambios temporales del inicio de la pubertad (21)(22).

▼M5

23. Antes del estudio debe seleccionarse cuidadosamente una dieta sin un nivel elevado de fitoestrógenos [véanse al respecto las referencias (6) y (9)] o de energía metabolizable para evitar introducir confusión en los resultados (15)(17)(19)(22)(36). El garantizar el comportamiento adecuado del sistema de ensayo utilizado por el laboratorio como se indica en los puntos 26 y 27 es una comprobación importante de estos dos factores. Como medida de seguridad coherente con unas buenas prácticas de laboratorio (BPL), deben tomarse muestras representativas de cada uno de los lotes de la dieta administrados durante el estudio, con vistas a efectuar posibles análisis del contenido de fitoestrógenos (por ejemplo, en el caso de unos elevados pesos uterinos de los animales de control respecto a los controles históricos, o de una respuesta inadecuada al estrógeno de referencia, el 17-alfa-etinil-estradiol). Deben analizarse alícuotas como parte del estudio o bien congelarse a – 20 °C o de forma que se evite que la muestra se descomponga antes de su análisis.

24. Algunos materiales de cama pueden contener sustancias estrogénicas o antiestrogénicas naturales (por ejemplo, se sabe que las mazorcas de maíz afectan a los ciclos estrales de las ratas y actúan como antiestrógenos). El material de cama seleccionado debe contener el mínimo posible de fitoestrógenos.

**Preparación de los animales**

25. Los animales de experimentación, que no deben mostrar signos de ningún tipo de enfermedad ni anomalías físicas, se reparten aleatoriamente entre los grupos de tratamiento y los de control. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la puesta de los animales en las mismas sean mínimos. Los animales se identifican inequívocamente. Es preferible que los animales inmaduros se alojen con sus madres o con madres de sustitución hasta el destete durante la aclimatación. La fase de aclimatación antes del inicio del estudio debe durar aproximadamente 5 días en el caso de los animales adultos jóvenes y en el de los animales inmaduros entregados con sus madres o con madres de sustitución. Si se obtienen animales inmaduros ya destetados sin las madres, puede imponerse una duración más corta de la fase de aclimatación, ya que la administración de la sustancia problema debe iniciarse inmediatamente tras el destete (véase el punto 29).

PROCEDIMIENTO

**Verificación de la competencia del laboratorio**

26. Para verificar la competencia del laboratorio pueden utilizarse dos opciones distintas:

— verificación periódica, sobre la base de un estudio del control positivo de referencia inicial (véase el punto 27); al menos cada 6 meses y cada vez que se produzca una modificación que pueda influir en el comportamiento del ensayo (por ejemplo, una nueva formulación de la dieta, un cambio en el personal que efectúe las disecciones, un cambio en la cepa de animales o en su proveedor, etc.) debe verificarse la sensibilidad del sistema de ensayo (modelo animal) utilizando una dosis adecuada (sobre la base del estudio del control positivo de referencia descrito en el punto 27) de un estrógeno de referencia: el 17a-etinil-estradiol (nº CAS 57-63-6) (EE);

— uso de controles simultáneos, mediante la inclusión de un grupo al que se le administra una dosis adecuada del estrógeno de referencia en cada ensayo.

Si el sistema no es capaz de responder según lo esperado, hay que examinar las condiciones experimentales y modificarlas en consecuencia. Se recomienda que la dosis del estrógeno de referencia utilizada en ambos enfoques sea aproximadamente la DE70 u 80.

▼M5

27. **Estudio del control positivo de referencia** Antes de que un laboratorio realice un estudio por primera vez según el presente método de ensayo, debe demostrar su competencia determinando la sensibilidad del modelo animal y estableciendo la relación dosis-respuesta de un estrógeno de referencia, el 17a-etinil-estradiol (nº CAS 57-63-6) (EE), con un mínimo de cuatro dosis. La respuesta del peso del útero se comparará con los datos históricos establecidos [véase la referencia (5)]. Si este estudio del control positivo de referencia no produce los resultados previstos, deberán examinarse y modificarse las condiciones experimentales.

**Número y estado de los animales**

28. Cada grupo tratado y de control ha de incluir al menos 6 animales (para los protocolos tanto del método con animales inmaduros como del de animales adultos ovx).

**Edad de los animales inmaduros**

29. Para el bioensayo uterotrófico con animales inmaduros debe especificarse el día de nacimiento. La administración de la sustancia problema ha de empezar lo suficientemente pronto como para garantizar que al término de dicha administración no ha tenido lugar aún la subida fisiológica de los estrógenos endógenos asociada a la pubertad. Por otra parte, hay indicios de que los animales muy jóvenes puede ser menos sensibles. Para definir la edad óptima, cada laboratorio debe tomar en consideración sus propios datos de referencia sobre la maduración.

Como norma general, la administración a ratas puede comenzar inmediatamente tras un destete temprano, el día postnatal 18 (considerándose que el día postnatal 0 es el del nacimiento). La administración a ratas debe estar completada de preferencia el día postnatal 21 y en cualquier caso antes del día postnatal 25, ya que a partir de esta edad se hace funcional el eje hipotálamo-hipófisis-ovarios y es posible que empiecen a subir los niveles de estrógenos endógenos, con una elevación concomitante de la media del peso uterino de referencia y un aumento de las desviaciones típicas de los grupos (2)(3)(10)(11)(12).

**Procedimiento para la ovariectomía**

30. Respecto a las ratas y ratonas que se han de ovariectomizar (grupos tanto de tratamiento como de control), la ovariectomía debe efectuarse cuando tienen entre 6 y 8 semanas de edad. En el caso de las ratas, deben pasar al menos 14 días entre la ovariectomía y el primer día de la administración, a fin de permitir que el útero retroceda a un peso de referencia estable y mínimo. En el caso de las ratonas, deben pasar al menos 7 días entre la ovariectomía y el primer día de la administración. Como una pequeña cantidad de tejido ovárico es suficiente para producir niveles significativos de estrógenos circulantes (3), antes de utilizar a los animales hay que examinarlos observando las células epiteliales recogidas por frotis vaginal durante al menos cinco días consecutivos (por ejemplo, los días 10-14 tras la ovariectomía en el caso de las ratas). No deben utilizarse los animales que presenten algún signo de inicio de un ciclo estral. Además, en la autopsia, deben examinarse los muñones ováricos para comprobar si queda algo de tejido ovárico. En caso afirmativo, el animal no debe utilizarse en los cálculos (3).

31. El procedimiento de ovariectomía se inicia con el animal, una vez anestesiado correctamente, en decúbito prono. La incisión de apertura de la pared abdominal dorso-lateral debe tener una longitud aproximada de 1 cm en el punto medio entre el reborde costal inferior y la cresta ilíaca, y estar a unos pocos milímetros del borde lateral del músculo lumbar. El ovario debe extraerse de la cavidad abdominal y ponerse en un campo aséptico. El ovario debe desconectarse en la unión del oviducto con el cuerpo uterino. Tras confirmar que no se está produciendo ninguna hemorragia fuerte, la pared abdominal se cierra mediante sutura y la piel mediante autoclips o sutura adecuada. En la figura 1 se indican esquemáticamente los puntos de ligadura. Debe aplicarse una analgesia postoperatoria adecuada, según lo recomendado por un veterinario con experiencia en el tratamiento de roedores.

▼M5

**Peso corporal**

32. En el método con hembras adultas ovx, el peso corporal y el peso uterino no están correlacionados puesto que el peso uterino se ve afectado por hormonas como los estrógenos, pero no por los factores de crecimiento que regulan el tamaño corporal. Por el contrario, el peso corporal está relacionado con el peso uterino en el modelo con hembras inmaduras, en la fase de maduración (34). Así pues, al principio del experimento, la variación de peso entre los animales empleados en el modelo con hembras inmaduras ha de ser mínima y no superar el ± 20 % del peso medio. Esto significa que el tamaño de la camada debe ser normalizado por el criador, para garantizar que los descendientes de madres diferentes se alimentan de forma aproximadamente igual. Los animales deben asignarse a los grupos (tanto de control como de tratamiento) mediante distribución aleatorizada de los pesos, de forma que la media del peso corporal de cada grupo no sea estadísticamente diferente de la de los demás grupos. Debe prestarse atención para evitar la asignación de animales de la misma camada al mismo grupo de tratamiento, en la medida de lo posible, sin incrementar el número de camadas que deban utilizarse en la investigación.

**Posología**

33. Con el fin de establecer si una sustancia problema puede tener acción estrogénica *in vivo,* normalmente es suficiente con dos grupos tratados y un grupo de control, por lo que este diseño es el preferido por razones de bienestar de los animales. Si la finalidad es obtener una curva dosis-respuesta o bien extrapolar a dosis más bajas, son necesarios al menos tres grupos tratados. Si hace falta obtener información más allá de la identificación de una actividad estrogénica (tal como una estimación de la potencia), debe considerarse una posología diferente. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del grupo de control deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia problema, el grupo de control recibirá la misma cantidad de vehículo utilizado con los grupos tratados (o el mayor volumen utilizado con los grupos de ensayo si hay diferencias entre los grupos).

34. El objetivo en el caso del bioensayo uterotrófico es seleccionar las dosis que garanticen la supervivencia y que no impliquen toxicidad significativa ni malestar para los animales después de tres días consecutivos de administración de la sustancia hasta una dosis máxima de 1 000 mg/kg/d. Todas las dosis deben proponerse y seleccionarse teniendo en cuenta los eventuales datos existentes sobre toxicidad, cinética o toxicocinética para la sustancia problema o productos afines. La dosis más alta debe tener en cuenta en primer lugar la DL50 y la información disponible sobre la toxicidad aguda, a fin de evitar la muerte y el sufrimiento o el dolor intenso de los animales (24)(25)(26). La dosis más alta debe representar la dosis máxima tolerada (DMT); también es aceptable un estudio realizado con una dosis que haya inducido una respuesta uterotrófica positiva. Como ensayo de cribado, es aceptable en general utilizar grandes intervalos entre las distintas dosis, como, por ejemplo, de media unidad logarítmica, correspondiente a un factor de progresión de las dosis de 3,2, o incluso hasta una unidad logarítmica. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio de determinación de la gama de dosis.

35. También, si la potencia estrogénica de un agonista puede estimarse con datos *in vitro* o *in silico,* es posible tener en cuenta estos datos para la selección de las dosis. Por ejemplo, la cantidad de la sustancia problema que produciría respuestas uterotróficas equivalentes a las del agonista de referencia (etinil-estradiol) se calcula a partir de su potencia *in vitro* en comparación con la del etinil-estradiol. La dosis máxima de ensayo se obtendría multiplicando esta dosis equivalente por un factor adecuado como, por ejemplo, 10 o 100.

▼M5

**Consideraciones para la determinación de la gama de dosis**

36. En caso de necesidad, puede llevarse a cabo con unos pocos animales un estudio previo de determinación de la gama de dosis. A este respecto, puede utilizarse el documento de orientación nº 19 de la OCDE (25), donde se definen los signos clínicos indicativos de toxicidad o de malestar de los animales. Cuando sea posible en este estudio de determinación de la gama de dosis, tras administrar la sustancia durante tres días, puede extraerse el útero y pesarse, una vez hayan transcurrido unas 24 horas desde la administración de la última dosis. Estos datos pueden utilizarse a continuación para ayudar a diseñar el estudio principal (selección de la dosis máxima aceptable y de las dosis más bajas, y recomendación del número de grupos de dosis).

**Administración de las dosis**

37. La sustancia problema se administra por vía oral forzada o inyección subcutánea. A la hora de elegir la vía de administración, han de tenerse en cuenta las consideraciones sobre el bienestar de los animales, junto con aspectos toxicológicos como la pertinencia para la vía de exposición humana a la sustancia (por ejemplo, vía oral forzada para simular la ingestión, inyección subcutánea para simular la inhalación o la adsorción cutánea), las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema y, en especial, la información toxicológica disponible y los datos sobre metabolismo y cinética (por ejemplo, necesidad de evitar el metabolismo de primer paso, mayor eficacia a través de una vía concreta).

38. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de una solución o suspensión acuosa. Sin embargo, dado que la mayoría de los ligandos estrogénicos o sus precursores metabólicos tienden a ser hidrófobos, el enfoque más común es el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz, de cacahuete, de sésamo o de oliva). Sin embargo, estos aceites presentan diferentes contenidos de calorías y de grasas, con lo que el vehículo podría afectar al total de energía metabolizable (EM), lo que podría alterar ciertos parámetros medidos, como el peso del útero, particularmente en el método con hembras inmaduras (33). Por lo tanto, antes de realizar el estudio, hay que someter a ensayo todos los vehículos utilizados, frente a controles sin vehículos. Las sustancias problema pueden disolverse en una cantidad mínima de etanol al 95 % u otro disolvente adecuado, y diluirse en el vehículo del ensayo hasta alcanzar las concentraciones finales de trabajo. Deben conocerse las características tóxicas del disolvente, y este debe someterse a ensayo por separado, en un grupo de control al que se administre solo el disolvente. Si la sustancia problema se considera estable, es posible recurrir a un calentamiento suave y a una acción mecánica vigorosa para ayudar a disolverla. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo. Si es estable en toda la duración del estudio, puede prepararse una alícuota inicial de la sustancia problema, y después preparar cada día las diluciones especificadas para la administración.

39. El calendario de la administración dependerá del modelo utilizado (véase el punto 29 en relación con el modelo de hembras inmaduras y el punto 30 en relación con el de hembras adultas ovx). Las ratas inmaduras reciben la sustancia problema diariamente, durante tres días consecutivos. Se recomienda también un tratamiento de tres días para ratas ovariectomizadas, pero pueden aceptarse exposiciones más largas, con la posibilidad de mejorar la detección de sustancias débilmente activas. Con ratonas ovariectomizadas, la aplicación durante tres días debe ser suficiente, y no aporta ninguna ventaja significativa la extensión del plazo a hasta siete días con agonistas estrogénicos fuertes; sin embargo, esta relación no se ha demostrado en el estudio de validación (16) en el caso de los estrógenos débiles, por lo que la administración debe ampliarse a hasta siete días consecutivos en ratonas adultas ovx.Las dosis deben administrarse todos los días a una hora similar. Deben ajustarse según sea necesario para mantener una dosis constante en términos de peso corporal del animal (por ejemplo, mg de sustancia problema por kg de peso corporal por día). En lo que respecta al volumen de ensayo, su variabilidad, por unidad de peso corporal, debe reducirse al mínimo ajustando la concentración de la solución administrada para garantizar un volumen constante por unidad de peso corporal con todas las dosis y con todas las vías de administración.

▼M5

40. Cuando la sustancia problema se administra por vía oral forzada, debe hacerse en una sola dosis diaria y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse en una sola vez depende del tamaño del animal utilizado. Deben seguirse las normas locales de tratamiento de animales, pero el volumen no debe superar los 5 ml/kg de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, con las que pueden utilizarse 10 ml/kg de peso corporal.

41. Cuando la sustancia problema se administra por inyección subcutánea, debe hacerse en una sola dosis diaria. Las dosis deben administrarse en las regiones dorsoescapular o lumbar con una aguja estéril (por ejemplo de calibre de 23 o 25 G) y una jeringuilla de tuberculina. Es opcional rasurar el lugar de la inyección. Deben registrarse los eventuales vertidos, las fugas en el punto de inyección o la administración incompleta de la sustancia problema. El volumen total inyectado por rata al día no debe superar los 5 ml/kg de peso corporal, dividido en dos lugares de inyección, excepto en el caso de soluciones acuosas, de las que pueden utilizarse 10 ml/kg de peso corporal.

**Observaciones**

*Observaciones generales y clínicas*

42. Deben hacerse observaciones clínicas generales al menos una vez al día, y con más frecuencia si se observan signos de toxicidad. Las observaciones deben llevarse a cabo preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período previsto de efecto máximo tras la administración. Todos los animales deben observarse para registrar su mortalidad y morbilidad y los signos clínicos generales, tales como cambios en el comportamiento, la piel, el pelo, los ojos, las mucosas, la presencia de secreciones y excreciones, y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.).

*Peso corporal y consumo de alimentos*

43. Todos los animales deben pesarse diariamente con precisión de 0,1 g, empezando justo antes de que se inicie el tratamiento, es decir, cuando los animales se asignan a los grupos. Con carácter optativo, es posible medir por jaula la cantidad de alimentos consumidos durante el período del tratamiento, pesando los alimentadores. Los resultados del consumo de alimentos deben expresarse en gramos por rata y por día.

*Disección y pesaje del útero*

44. Veinticuatro horas después del último tratamiento, las ratas se sacrificarán de forma compasiva. Lo ideal es que el orden de la autopsia se aleatorice entre los distintos grupos para evitar una progresión directa de los grupos de más dosis a los de menos (o viceversa), que podría afectar sutilmente a los datos. El objetivo del bioensayo es medir el peso de los úteros tanto húmedos como secos. El peso húmedo incluye el útero y el contenido de líquido luminal. El peso seco se mide después de haber exprimido y retirado el contenido luminal del útero.

45. Antes de su disección, la vagina se examinará para observar su estado de apertura en los animales inmaduros. El procedimiento de disección comienza con la apertura de la pared abdominal a partir de la sínfisis púbica. A continuación, se desprenden de la pared abdominal dorsal los cuernos uterinos y los ovarios, si están presentes. La vejiga urinaria y los uréteres se separan de las caras ventral y lateral del útero y de la vagina. Se desprenden las adherencias fibrosas entre el recto y la vagina hasta que pueda identificarse la unión del orificio vaginal con la piel perineal. El útero y la vagina se desprenden del cuerpo cortando la pared vaginal justo por encima de la unión con la piel perineal como se muestra en la figura 2. El útero debe

▼M5

separarse del cuerpo cortando delicadamente el mesenterio uterino en el punto de su inserción a lo largo de toda la longitud de la cara dorsolateral de cada cuerno uterino. Una vez retirado del cuerpo, la manipulación del útero debe ser lo suficientemente rápida para impedir la desecación de los tejidos. La pérdida de peso debida a la desecación se vuelve más importante con tejidos pequeños, tales como el útero (23). Si están presentes, los ovarios se retiran a la altura de los oviductos, evitando la pérdida de líquido luminal por el cuerno uterino. Si el animal ha sido ovariectomizado, hay que examinar los muñones para detectar la posible presencia de algún tejido ovárico. Debe retirarse el exceso de grasa y de tejido conjuntivo. La vagina se retira del útero justo por debajo del cuello uterino, de forma que este siga unido al cuerpo del útero, como se indica en la figura 2.

46. Cada útero debe transferirse a un recipiente marcado de manera inequívoca y tarado (por ejemplo, una placa de Petri o una navecilla de pesaje de plástico), prestando siempre atención para evitar la desecación antes del pesaje (por ejemplo, puede colocarse en el recipiente un trozo de papel de filtro ligeramente humedecido con solución salina). Debe pesarse el útero con el líquido luminal (peso uterino húmedo), con una precisión de 0,1 mg.

47. Cada útero se trata a continuación por separado para retirarle el líquido luminal. Los dos cuernos uterinos se perforan o cortan longitudinalmente. El útero se coloca sobre un trozo de papel de filtro ligeramente humedecido (por ejemplo, Whatman n$^{o}$ 3) y se le aplica una ligera presión con otro trozo de papel de filtro ligeramente humedecido, para eliminar completamente el líquido luminal. Debe pesarse el útero sin el contenido luminal (peso uterino seco), con una precisión de 0,1 mg.

48. El peso del útero en el momento del sacrificio puede utilizarse para asegurarse de que no se ha superado la edad adecuada en la rata inmadura intacta; sin embargo, son decisivos al respecto los datos históricos de la cepa de ratas utilizada en el laboratorio (véase el punto 56 en cuanto a la interpretación de los resultados).

*Investigaciones optativas*

49. Tras efectuar el pesaje, los úteros pueden fijarse en formol al 10 % amortiguado a pH neutro para su examen histopatológico previa tinción con hematoxilina y eosina (HE). La vagina puede investigarse adecuadamente (véase el punto 9). Además, puede efectuarse con fines de comparación cuantitativa una medición morfométrica del epitelio del endometrio.

DATOS E INFORME

**Datos**

50. Los datos del estudio deben incluir:

— el número de animales al inicio del ensayo,

— el número y la identidad de los animales encontrados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, y la fecha y la hora de la muerte o del sacrificio compasivo,

— el número y la identidad de los animales que presenten signos de toxicidad, y una descripción de los signos de toxicidad observados, con inclusión del momento de aparición, la duración y la gravedad de los efectos tóxicos, y

— el número y la identidad de los animales que presenten lesiones y una descripción del tipo de lesiones.

▼M5

51. Deben registrarse los datos de cada animal relativos al peso corporal, el peso uterino húmedo, y el peso uterino seco. Deben utilizarse análisis estadísticos unilaterales de los agonistas para determinar si la administración de una sustancia problema ha provocado un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) del peso uterino. Deben llevarse a cabo análisis estadísticos apropiados para determinar los eventuales cambios del peso uterino seco y húmedo relacionados con el tratamiento. Por ejemplo, los datos pueden evaluarse mediante un análisis de la covarianza (ANCOVA) con el peso corporal en la autopsia como covariable. Antes del análisis de los datos uterinos, se les puede aplicar una transformación logarítmica de estabilización de la varianza. La prueba de Dunnett y Hsu es adecuada para hacer comparaciones por parejas de cada uno de los grupos tratados respecto a los grupos de control del vehículo, y para calcular los intervalos de confianza. Pueden utilizarse gráficas residuales estudentizadas para detectar posibles valores atípicos y evaluar la homogeneidad de las varianzas. Estos procedimientos se aplicaron en el programa de validación de la OCDE utilizando el PROC GLM en el sistema de análisis estadísticos (SAS Institute, Cary, NC), versión 8 (6)(7).

52. El informe final debe contener lo siguiente:

*Instalaciones de ensayo:*

— Personal responsable y sus tareas en el estudio

— Datos del ensayo del control positivo de referencia y datos de los controles positivos periódicos (véanse los puntos 26 y 27)

*Sustancia problema:*

— Caracterización de las sustancias problema

— Naturaleza física y, cuando sea pertinente, propiedades fisicoquímicas

— Método y frecuencia de la preparación de las diluciones

— Eventuales datos obtenidos sobre la estabilidad

— Eventuales análisis de las soluciones administradas

*Vehículo:*

— Caracterización del vehículo del ensayo (naturaleza, proveedor y lote)

— Justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua

*Animales de experimentación:*

— Especie y cepa, y justificación de su elección

— Proveedor e instalación específica del proveedor

— Edad de suministro con la fecha de nacimiento

— En caso de animales inmaduros, si se han suministrado o no con sus madres o con madres de sustitución, y la fecha del destete

— Datos del procedimiento de aclimatación de los animales

— Número de animales de cada jaula

— Datos y método de identificación de cada animal y de los grupos

*Condiciones del ensayo:*

— Datos del proceso de aleatorización (es decir, método utilizado)

— Justificación de la selección de la dosis

▼**M5**

— Datos sobre la formulación de la sustancia problema, su concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad

— Datos de la administración de la sustancia problema y justificación de la elección de la vía de exposición

— Dieta (denominación, tipo, proveedor, contenido, y, si se conocen, los niveles de fitoestrógenos)

— Origen del agua (por ejemplo, agua del grifo o agua filtrada) y suministro (por tubos a partir de un gran depósito, en botellas, etc.)

— Camas (denominación, tipo, proveedor y contenido)

— Registro de las condiciones de alojamiento en las jaulas, intervalo de iluminación, temperatura y humedad del local, limpieza de este

— Descripción detallada de los procedimientos de autopsia y de pesaje de los úteros

— Descripción de los métodos estadísticos

*Resultados*

*Respecto a cada animal:*

— Todos los pesos corporales individuales diarios (desde la asignación en grupos hasta la autopsia) (con precisión de 0,1 g)

— Edad de cada animal (en días contados a partir del día de nacimiento, que es el día 0) cuando se inicia la administración de la sustancia problema

— Fecha y hora de cada administración de la sustancia problema

— Volúmenes y cantidades calculados que se han administrado y observaciones de las eventuales pérdidas de dosis durante o tras la administración

— Anotación diaria del estado de los animales, incluidos los síntomas y observaciones pertinentes

— Causa sospechada de la muerte (si durante el estudio se encuentran animales moribundos o muertos)

— Fecha y hora del sacrificio compasivo, con el intervalo de tiempo transcurrido desde la última administración

— Peso uterino húmedo (con precisión de 0,1 mg) y eventuales observaciones sobre pérdidas del líquido luminal durante la disección y la preparación para el pesaje

— Peso uterino seco (con precisión de 0,1 mg)

*Respecto a cada grupo de animales:*

— MEDIA de los pesos corporales diarios (con precisión de 0,1 g) y desviaciones típicas (desde la asignación en grupos hasta la autopsia)

— MEDIA de los pesos uterinos húmedos y media de los pesos uterinos secos (con precisión de 0,1 mg) y desviaciones típicas

— Si se ha medido, el consumo diario de alimentos (calculado como gramos de alimentos consumidos por animal)

▼M5

— Resultados de los análisis estadísticos de comparación de los pesos uterinos húmedo y seco de los grupos tratados respecto a los mismos parámetros medidos en los grupos de control del vehículo

— Resultados de los análisis estadísticos de comparación de los pesos corporales totales y del aumento de peso corporal de los grupos tratados respecto a los mismos parámetros medidos en los grupos de control del vehículo.

53. Resumen de los datos importantes del método de ensayo

| | **Ratas** | **Ratonas** |
|---|---|---|
| **Animales** | | |
| Cepa | Cepa de roedores utilizada habitualmente en laboratorio | |
| Número de animales | Mínimo de 6 animales por grupo de dosis | |
| Número de grupos | Mínimo de dos grupos de tratamiento (véase el punto 33 al respecto) y un grupo de control negativo<br>En los puntos 26 y 27 se encuentran orientaciones sobre los grupos de control positivo. | |
| **Condiciones de alojamiento y alimentación** | | |
| T° en el local de los animales | 22 °C ± 3 °C | |
| Humedad relativa | 50-60 %, y no inferior al 30 % ni superior al 70 % | |
| Secuencia de iluminación diaria | 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad | |
| Dieta y agua de bebida | Ad libitum | |
| Alojamiento | Individualmente o en grupos de hasta tres animales (se recomienda el alojamiento en grupos sociales para los animales inmaduros) | |
| Dieta y cama | Bajo nivel de fitoestrógenos recomendado en la dieta y en la cama | |
| **Protocolo** | | |
| Método | Método con hembras inmaduras no ovariectomizadas (método preferido)<br>Método con hembras adultas ovariectomizadas | Método con hembras adultas ovariectomizadas |
| Edad a la que se administra la sustancia a los animales inmaduros | DPN 18 como pronto. La administración debe estar terminada antes del DPN 25. | No pertinente en el ámbito de aplicación del presente método de ensayo |
| Edad a la que se efectúa la ovariectomía | Entre 6 y 8 semanas de edad | |
| Edad a la que se administra la sustancia a los animales ovariectomizados | Deben pasar al menos 14 días entre la ovariectomía y el primer día de la administración. | Deben pasar al menos 7 días entre la ovariectomía y el primer día de la administración. |
| Peso corporal | La variación del peso corporal debe ser mínima y no superar el ± 20 % del peso medio. | |

▼M5

| | Ratas | Ratonas |
|---|---|---|
| **Administración de la sustancia** | | |
| Vía de administración | Vía oral forzada o inyección subcutánea | |
| Frecuencia de la administración | Una sola dosis diaria | |
| Volumen administrado por vía oral forzada o por inyección | ≤ 5ml/kg peso corporal (o hasta 10 ml/kg peso corporal en caso de soluciones acuosas) (en 2 lugares de inyección si se utiliza la vía subcutánea) | |
| Duración de la administración | 3 días consecutivos con animales inmaduros<br>Mínimo de 3 días consecutivos con animales ovx | Mínimo de 7 días consecutivos con animales ovx |
| Momento de la autopsia | Unas 24 horas desde la administración de la última dosis | |
| **Resultados** | | |
| Respuesta positiva | Aumento estadísticamente significativo del peso medio del útero (húmedo y/o seco) | |
| Estrógeno de referencia | 17α-etinil-estradiol | |

ORIENTACIÓN PARA LA INTERPRETACIÓN Y LA ACEPTACIÓN DE LOS RESULTADOS

54. En general, debe considerarse que un ensayo de estrogenicidad es positivo si en él se ve un aumento estadísticamente significativo del peso uterino ($p < 0,05$), al menos con la dosis más elevada, comparando con el grupo de control del disolvente. El resultado positivo se ve respaldado también por la demostración de una relación verosímil desde el punto de vista biológico entre la dosis y la magnitud de la respuesta, teniendo en cuenta que el solapamiento de las actividades estrogénicas y antiestrogénicas de la sustancia problema puede afectar a la forma de la curva dosis-respuesta.

55. Debe tenerse cuidado de no sobrepasar la dosis máxima tolerada, para que se pueda hacer una interpretación significativa de los datos. A este respecto, deben evaluarse a fondo la eventual reducción del peso corporal, la presencia de signos clínicos y otras observaciones.

56. Una consideración importante para la aceptación de los datos del bioensayo uterotrófico es la de los pesos uterinos del grupo de control del vehículo. Unos elevados valores del control pueden comprometer la sensibilidad del bioensayo y su capacidad de detectar agonistas estrogénicos muy débiles. Del análisis de la bibliografía y de los datos obtenidos durante la validación del bioensayo uterotrófico se deduce que hay casos espontáneos de medias elevadas en los controles, sobre todo en animales inmaduros (2)(3)(6)(9). Como el peso uterino de las ratas inmaduras depende de muchas variables, como la cepa o el peso corporal, no puede indicarse ningún límite superior definitivo para este peso. A modo de guía, si los pesos uterinos secos de las ratas de control inmaduras están comprendidos entre 40 y 45 mg, los resultados deben considerarse sospechosos y unos pesos uterinos superiores a 45 mg pueden justificar que se repita el ensayo. Sin embargo, esto debe estudiarse caso por caso (3)(6)(8). Cuando se utilizan ratas adultas, si la ovariectomía es incompleta quedará tejido ovárico que puede producir estrógenos endógenos y frenar el retroceso del peso uterino.

▼**M5**

57. Se ha visto que se obtienen resultados aceptables con unos pesos uterinos secos del control del vehículo inferiores al 0,09 % del peso corporal en el caso de las ratas inmaduras e inferiores al 0,04 % en el de las adultas jóvenes ovariectomizadas [véase el cuadro 31 (2)]. Si los pesos uterinos del control son superiores a estas cifras, deberían examinarse diversos factores, como la edad de los animales, la calidad de la ovariectomía, la presencia de fitoestrógenos en la dieta, etc., y habría que considerar con precaución un resultado del ensayo negativo (sin indicación de actividad estrogénica).

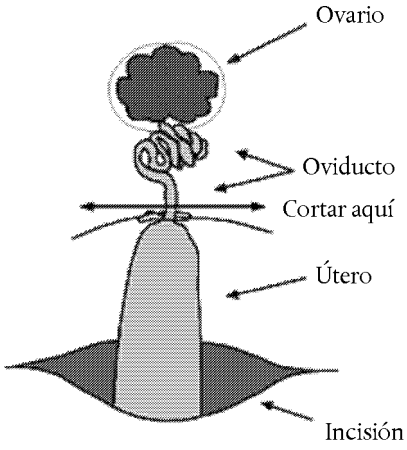
58. Deben mantenerse en el laboratorio los datos históricos de los grupos de control del vehículo. También deben conservarse en el laboratorio los datos históricos de las respuestas a estrógenos positivos de referencia, tales como el 17a-etinil-estradiol. Los laboratorios pueden ensayar también la respuesta a agonistas estrogénicos débiles conocidos. Todos estos datos pueden compararse con los datos disponibles (2)(3)(4)(5)(6)(7)(8), con el fin de asegurarse de que los métodos del laboratorio ofrecen la suficiente sensibilidad.

59. En el estudio de validación de la OCDE, los pesos uterinos secos han mostrado menos variabilidad que los pesos uterinos húmedos (6)(7). Sin embargo, una respuesta significativa en alguna de las dos medidas indicaría que la sustancia problema es positiva para la actividad estrogénica.

60. La respuesta uterotrófica no es únicamente de origen estrogénico; no obstante, un resultado positivo del bioensayo uterotrófico debe interpretarse generalmente como prueba de potencial estrogénico *in vivo,* y debe lanzar en principio el procedimiento para aclarar la situación (véase el punto 9 y el «Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos», anexo 2).

*Figura 1*

**Diagrama esquemático de la extracción quirúrgica de los ovarios**



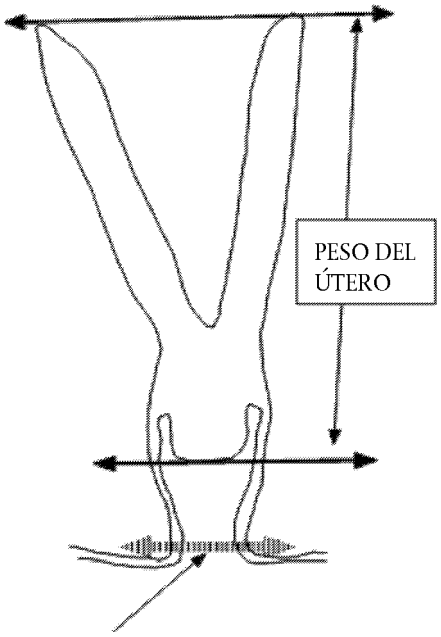

No se indican el mesometrio, los vasos sanguíneos ni el cuerpo adiposo.

El procedimiento se inicia con la apertura de la pared abdominal dorso-lateral en el punto medio entre el reborde costal inferior y la cresta ilíaca, y a unos pocos milímetros del borde lateral del músculo lumbar. Dentro de la cavidad abdominal, hay que localizar los ovarios. En un campo aséptico, a continuación se extraen los ovarios físicamente de la cavidad abdominal, se hace una ligadura entre el ovario y el útero para detener la hemorragia, y se separa el ovario mediante incisión por encima de la ligadura en la unión entre el oviducto y cada cuerno uterino. Tras confirmar que no persiste ninguna hemorragia significativa, la pared abdominal se cierra mediante sutura y la piel mediante autoclips o sutura adecuada, por ejemplo. Debe dejarse un mínimo de 14 días antes de utilizar los animales, para que puedan recuperarse de la operación y que retroceda el peso de los úteros.

▼**M5**

*Figura 2*

**Separación y preparación de los tejidos uterinos para el pesaje**




El procedimiento comienza con la apertura de la pared abdominal al nivel de la sínfisis púbica. A continuación, cada uno de los ovarios, si están presentes, y los cuernos uterinos se desprenden de la pared abdominal dorsal. La vejiga urinaria y los uréteres se separan de las caras ventral y lateral del útero y de la vagina. Se desprenden las adherencias fibrosas entre el recto y la vagina hasta que pueda identificarse la unión del orificio vaginal con la piel perineal. El útero y la vagina se desprenden del cuerpo cortando la pared vaginal justo por encima de la unión con la piel perineal como se muestra en la figura. El útero debe separarse del cuerpo cortando delicadamente el mesenterio uterino en el punto de su inserción a lo largo de toda la longitud de la cara dorsolateral de cada cuerno uterino. Una vez desprendido el útero del organismo, se retira el exceso de grasa y de tejido conjuntivo. Si están presentes, los ovarios se retiran a la altura de los oviductos evitando la pérdida de líquido luminal por el cuerno uterino. Si el animal ha sido ovariectomizado, hay que examinar los muñones para detectar la posible presencia de algún tejido ovárico. La vagina se retira del útero justo por debajo del cuello uterino, de forma que este siga unido al cuerpo del útero, como se indica en la figura. En ese momento puede pesarse el útero.

▼**M5**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Antiestrogenicidad**: Capacidad de una sustancia de suprimir la acción del 17ß-estradiol en un mamífero.

**Sustancia**: Sustancia o mezcla

**Fecha de nacimiento**: Día postnatal 0.

**Posología**: Término general que abarca la dosis administrada, y la frecuencia y duración de la administración.

**Dosis**: Cantidad de sustancia problema administrada. Para el bioensayo uterotrófico, la dosis se expresa en peso de sustancia problema por unidad de peso corporal del animal sometido al experimento por día (por ejemplo, mg/kg peso corporal/día).

**Dosis máxima tolerable (DMT)**: La mayor cantidad de una sustancia que, cuando se introduce en el organismo, no mata a los animales de experimentación (indicada con la sigla $DL_0$) (IUPAC 1993).

**Estrogenicidad**: Capacidad de una sustancia de actuar como el 17ß-estradiol en un mamífero.

**Día postnatal X**: Día nº X de vida a partir de la fecha de nacimiento.

**Sensibilidad**: Proporción de todas las sustancias activas/positivas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados inequívocos, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo.

**Especificidad**: Proporción de todas las sustancias inactivas/negativas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados inequívocos, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo.

**Sustancia problema**: Toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Uterotrófico**: Término utilizado para describir un efecto positivo sobre el crecimiento de los tejidos uterinos.

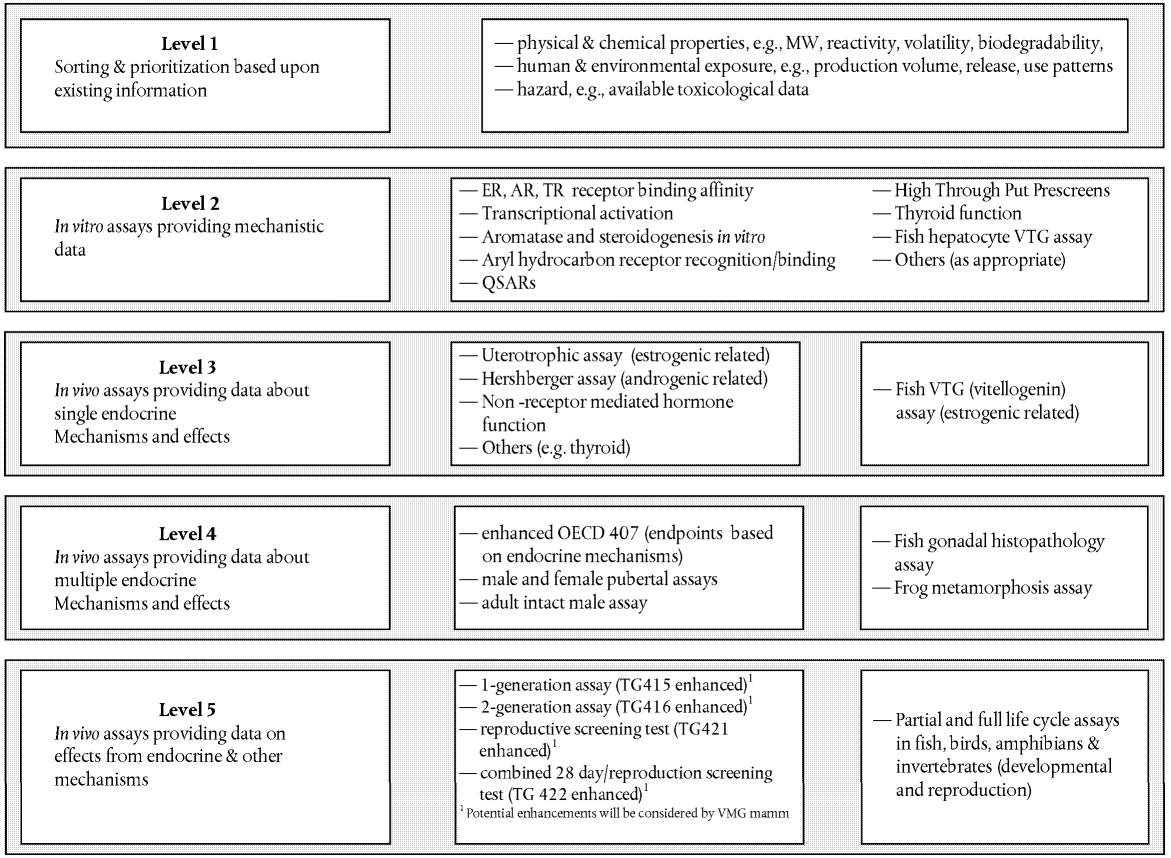
**Validación**: Proceso científico diseñado para caracterizar las exigencias y limitaciones operativas de un método de ensayo y demostrar su fiabilidad y pertinencia para un fin particular.

▼M5

*Apéndice 2*

**Note:** Document prepared by the Secretariat of the Test Guidelines Programme based on the agreement reached at the 6th Meeting of the EDTA Task Force

**OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals**




VMG mamm: Grupo de gestión de la validación de ensayos con mamíferos y su evaluación

▼**M5**

NOTAS RELATIVAS AL MARCO CONCEPTUAL

*Nota 1.* Es posible entrar en el marco y dejarlo en cualquier nivel, en función de la naturaleza de la información que se necesite para la evaluación del peligro y del riesgo.

*Nota 2.* En el nivel 5, la ecotoxicología debe incluir parámetros que indiquen los mecanismos de los efectos adversos y los posibles daños a la población.

*Nota 3.* Cuando un modelo multimodal cubre varios ensayos de un mismo parámetro, este modelo puede sustituir a los ensayos individuales de ese parámetro.

*Nota 4.* La evaluación de cada sustancia debe hacerse caso por caso, teniendo en cuenta toda la información disponible, sin olvidar la función de cada uno de los niveles del marco conceptual.

*Nota 5.* No debe considerarse que el marco conceptual sea exhaustivo en el momento actual. En los niveles 3, 4 y 5 se incluyen ensayos que están disponibles o cuya validación está en curso. Con respecto a estos últimos, su inclusión tiene carácter provisional. Una vez desarrollados y validados, se inscribirán oficialmente en el marco conceptual.

*Nota 6.* No debe considerarse que el nivel 5 incluya solo ensayos definitivos. Se considera que los ensayos incluidos en este nivel contribuyen a la evaluación general del peligro y del riesgo.

▼M5

**BIBLIOGRAFÍA**


(1) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, $10^{th}$-$11^{th}$ March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) OCDE (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.

(3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445-520.

(4) OCDE (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay-Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.

(5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785-94.

(6) OCDE (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2-Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.

(7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two-Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549

(8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.

(9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.

(10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [$I^{125}$]iodeoxyuridine. Endocrinology 113:582-587.

(11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17b-estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.

(12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10-15.

(13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650-651.

(14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425-427.

(15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369-373.

▼**M5**

(16) OCDE (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.

(17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. Toxicol. Lett. 128:145-157.

(18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. Food Chem. Toxicol. 41:1517-1525.

(19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. Arch. Toxicol. 76:613-620.

(20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. Comp. Med. 53:477-485.

(21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. J. Appl. Toxicol.20:343-347.

(22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. Cancer Detect. Prev. 26:381-393.

(23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. Lab. Anim. Sci.37:596-601.

(24) OCDE (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(25) OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(26) OCDE (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. J. Physiol. 85: 320-333.

(28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. Endocrinology 19: 33-41.

(29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. Fundam. Appl. Toxicol. 34: 288-305.

(30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. Fertil. Steril. 24: 284 — 291.

(31) OCDE (1982). Organization for Economic Co-operation and Development-Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, Paris.

(32) Dorfman R.I. (1962). Methods in Hormone Research, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. Nueva York, Academic Press.

(33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. ILAR J 45(4): 401-416.

▼**M5**

(34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. Toxicol Ind Health. 14 (1-2): 159-184.

(35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. Science 131:1807-1808.

(36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. J. Agric Food Chem. 52, 1410-1414.

(37) OCDE (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. 71.

(38) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.

▼M5

B.55. **BIOENSAYO DE HERSHBERGER CON RATAS: ENSAYO DE CRIBADO A CORTO PLAZO DE LAS PROPIEDADES (ANTI)ANDROGÉNICAS**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 441 (2009). La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos de cribado y finales de posibles alteradores endocrinos (1). Uno de los elementos de la actividad consistía en elaborar unas directrices para el bioensayo de Hershberger con ratas. Este ensayo, después de haberse utilizado durante varias décadas en el sector farmacéutico, fue normalizado por primera vez en 1962 por un comité de expertos oficiales, como herramienta para el cribado de sustancias androgénicas (2). Entre 2001 y 2007, el bioensayo de Hershberger con ratas ha sido objeto de un amplio programa de validación, que incluía la elaboración de un documento de revisión de referencia (23), la recopilación de un documento detallado sobre métodos (3), la elaboración de una guía sobre disección (21) y la realización de extensos estudios intra e interlaboratorios para mostrar la fiabilidad y la reproducibilidad del bioensayo. Estos estudios de validación se llevaron a cabo con un potente andrógeno de referencia [propionato de testosterona (PT)], dos potentes andrógenos sintéticos (acetato de trembolona y metil-testosterona), un potente medicamento antiandrogénico (flutamida), un potente inhibidor (finasterida) de la síntesis del andrógeno natural dihidrotestosterona (DHT), varios plaguicidas débilmente antiandrogénicos (linurón, vinclozolina, procimidona, p,p'-DDE), un potente inhibidor de la 5α-reductasa (finasterida) y dos sustancias negativas conocidas (dinitrofenol y nonilfenol) (4)(5)(6)(7)(8). El presente método de ensayo es el resultado de la larga experiencia histórica con el bioensayo y de la experiencia adquirida durante el programa de validación, así como de los resultados obtenidos en este.

2. El bioensayo de Hershberger es un ensayo de cribado a corto plazo *in vivo* que utiliza tejidos secundarios del aparato reproductor masculino. El ensayo surgió en la década de 1930 y se modificó en la de 1940 para incluir músculos del aparato reproductor masculino sensibles a los andrógenos (2)(9-15). En la década de 1960 se evaluaron más de 700 posibles andrógenos utilizando una versión normalizada del protocolo (2)(14), y en esa misma década se consideró utilizar el ensayo como un método normalizado para estudiar tanto andrógenos como antiandrógenos (2)(15). El bioensayo actual se basa en los cambios de peso de cinco tejidos de ratas macho castradas peripuberales, tejidos que son sensibles a los andrógenos. Evalúa la capacidad de una sustancia para provocar actividades biológicas características de agonistas o antagonistas androgénicos, o de inhibidores de la 5α-reductasa. Los cinco tejidos diana sensibles a los andrógenos que se incluyen en el presente método de ensayo son la próstata ventral (PV), la vesícula seminal (VS) (con los líquidos y las glándulas coagulantes), el músculo elevador del ano con el músculo bulbocavernoso (EABC), la pareja de glándulas de Cowper (GCW) y el glande del pene (GP). En las ratas macho castradas peripuberales, estos cinco tejidos responden a los andrógenos con un aumento del peso absoluto. Cuando estos mismos tejidos se estimulan para incrementar su peso mediante la administración de un andrógeno potente de referencia, estos cinco tejidos responden a los antiandrógenos con una disminución de su peso absoluto. El modelo primario para el bioensayo de Hershberger es el macho peripuberal castrado quirúrgicamente, que se validó en las fases 1, 2 y 3 del programa de validación de Hershberger.

3. Este bioensayo de Hershberger sirve de ensayo de cribado del mecanismo *in vivo* de agonistas y antagonistas androgénicos y de inhibidores de la 5a-reductasa, y su aplicación debe considerarse en el contexto del ‘OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals’ (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación

▼M5

de los alteradores endocrinos) (apéndice 2). En este marco conceptual el bioensayo de Hershberger figura en el nivel 3 como ensayo *in vivo* que proporciona datos sobre un solo mecanismo endocrino, es decir, la (anti)androgenicidad. Se pretende incluir este bioensayo en una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* para identificar las sustancias con potencial para interactuar con el sistema endocrino, lo que desembocará finalmente en evaluaciones del peligro y del riesgo para la salud humana o el medio ambiente.

4. Debido a las preocupaciones que implica la castración sobre el bienestar de los animales, se buscó un modelo alternativo para el bioensayo de Hershberger con machos intactos (sin castrar) destetados estimulados, a fin de evitar la fase de castración. Se validó el método de ensayo con animales destetados estimulados (24); sin embargo, en los estudios de validación no se vio que la versión del bioensayo de Hershberger con estos animales destetados pudiera detectar sistemáticamente los efectos que tienen, sobre el peso de los órganos sensibles a los andrógenos, las sustancias antiandrogénicas débiles a las dosis estudiadas. Por lo tanto, no se incluye en el presente método de ensayo. Sin embargo, reconociendo que su uso no solo puede mejorar el bienestar de los animales, sino también ofrecer información sobre otros modos de acción, se encuentra en el documento de orientación de la OCDE 115 (25).

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

5. Los agonistas y antagonistas androgénicos actúan como ligandos del receptor androgénico y pueden activar o inhibir, respectivamente, la transcripción de genes controlada por el receptor. Además, algunas sustancias inhiben la conversión de la testosterona en dihidrotestosterona, que es un andrógeno natural más potente, en algunos tejidos diana de los andrógenos (inhibidores de la 5a-reductasa). Estas sustancias pueden provocar peligros para la salud, incluidos ciertos efectos sobre la reproducción y el desarrollo. Por lo tanto, desde el punto de vista de la normativa es necesario evaluar con rapidez las sustancias que puedan ser agonistas o antagonistas androgénicos o inhibidores de la 5a-reductasa. Aunque de carácter informativo, la afinidad de un ligando por un receptor androgénico, medida por la unión al receptor o por la activación transcripcional de genes marcadores *in vitro,* no es el único factor determinante de un posible peligro. Otros factores determinantes son la activación y desactivación metabólica de la sustancia al entrar en el organismo, su distribución en los tejidos diana, y su eliminación del organismo. Esto lleva a la necesidad de detectar la posible actividad de una sustancia *in vivo* en las condiciones y exposición relevantes. La evaluación *in vivo* es menos crítica si se conocen las características de la sustancia en cuanto a su absorción — distribución — metabolismo — eliminación (ADME). Los tejidos sensibles a los andrógenos responden con un rápido y vigoroso crecimiento cuando se estimulan con andrógenos, especialmente en las ratas macho castradas peripuberales. Diversas especies de roedores, especialmente la rata, se utilizan también ampliamente en estudios de toxicidad para la caracterización de los peligros. Por consiguiente, la versión del ensayo que utiliza ratas peripuberales castradas y los cinco tejidos diana es adecuada para el cribado *in vivo* de los agonistas y antagonistas androgénicos y de los inhibidores de la 5a-reductasa.

6. El presente método de ensayo se basa en los protocolos empleados en el estudio de validación de la OCDE que han demostrado ser fiables y reproducibles en estudios intra e interlaboratorios (4)(5)(6)(7)(8). En el presente método de ensayo se recogen procedimientos para sustancias tanto androgénicas como antiandrogénicas.

7. Aunque ha habido cierta variación en la dosis de PT utilizada, para detectar antiandrógenos en el programa de validación del bioensayo de Hershberger de la OCDE, por los diferentes laboratorios (0,2 frente a 0,4 mg/kg/día, en inyección subcutánea), se ha encontrado poca diferencia entre estas dos variantes del protocolo en cuanto a la capacidad de detectar una actividad antiandrogénica débil o fuerte. Sin embargo, es evidente que la dosis de PT no ha de ser tan alta como para bloquear los efectos de los antagonistas débiles del receptor androgénico (RA) ni tan baja como para que los tejidos androgénicos tengan una respuesta de escaso crecimiento incluso sin la administración conjunta de un antiandrógeno.

▼M5

8. La respuesta de crecimiento de los distintos tejidos sensibles a los andrógenos no es únicamente de origen androgénico, es decir, ciertas sustancias que no son agonistas androgénicos pueden alterar el peso de determinados tejidos. Sin embargo, una respuesta de crecimiento de varios tejidos de forma concomitante avala que se trata de un mecanismo androgénico más específico. Por ejemplo, con dosis elevadas de estrógenos potentes se puede aumentar el peso de las vesículas seminales; sin embargo, los demás tejidos sensibles a los andrógenos utilizados en el ensayo no responden de forma similar. Las sustancias antiandrogénicas pueden actuar bien como antagonistas del receptor androgénico o bien como inhibidores de la 5a-reductasa. Los inhibidores de la 5a-reductasa tienen un efecto variable, ya que la conversión en dihidrotestosterona, más potente, varía según el tejido. Los antiandrógenos que inhiben la 5α — reductasa, como la finasterida, tienen efectos más pronunciados en la próstata ventral que en los otros tejidos, en comparación con un antagonista potente del RA, como la flutamida. Esta diferencia en la respuesta según los tejidos puede aprovecharse para distinguir entre los modos de acción mediados por el RA y los mediados por la 5α — reductasa. Además, el receptor androgénico está relacionado evolutivamente con el de otras hormonas esteroideas, y algunas otras hormonas, si se administran a dosis altas, suprafisiológicas, pueden unirse a los receptores y antagonizar los efectos de aumento del crecimiento del PT (13). Además, también es verosímil que un aumento del metabolismo de los esteroides y el consiguiente descenso de la testosterona presente en el suero reduzcan el crecimiento de los tejidos sensibles a los andrógenos. Por tanto, un eventual resultado positivo en el bioensayo de Hershberger debe evaluarse normalmente aplicando un planteamiento de ponderación de las pruebas, con inclusión de ensayos *in vitro,* tales como los ensayos de unión alRAy a los receptores estrogénicos (RE) y los correspondientes ensayos de activación de la transcripción, o con otros ensayos *in vivo* que examinen tejidos diana androgénicos similares, tales como el ensayo sobre la pubertad con machos, el ensayo con machos adultos intactos de 15 días, o los estudios con administración continuada de 28 o de 90 días.

9. La experiencia indica que los andrógenos xenobióticos son más raros que los antiandrógenos xenobióticos. Puede esperarse, pues, que el bioensayo de Hershberger se utilice con más frecuencia para el cribado de antiandrógenos. No obstante, el procedimiento de ensayo de andrógenos podría recomendarse para sustancias esteroideas o similares, o para sustancias de las cuales se haya deducido una indicación de posibles efectos androgénicos con los métodos que figuran en los niveles 1 o 2 del marco conceptual (apéndice 2). Del mismo modo, en los ensayos de nivel 5 se pueden observar efectos adversos asociados con perfiles (anti)androgénicos, lo que hace necesario evaluar si una sustancia actúa siguiendo un modo de acción endocrino.

10. Se acepta que todos los procedimientos en los que se utilicen animales deben atenerse a las normas locales de tratamiento de animales; las descripciones de tratamiento y atención de animales recogidas más adelante constituyen requisitos mínimos de comportamiento, y quedarán anuladas por las normas locales, tales como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (26). La OCDE proporciona más orientaciones sobre el tratamiento compasivo de los animales (17).

11. Como en cualquier bioensayo con animales de experimentación, debe prestarse una atención especial a la necesidad de llevar a cabo el estudio. Básicamente, puede haber dos motivos para tomar una decisión de ese tipo:

— un elevado potencial de exposición (nivel 1 del marco conceptual) o indicios de (anti)androgenicidad en ensayos *in vitro* (nivel 2) que avalen la realización de investigaciones sobre si estos efectos pueden producirse *in vivo;*

— efectos concordantes con (anti)androgenicidad en ensayos *in vivo* de los niveles 4 o 5 que avalen la realización de investigaciones sobre el modo de acción específico, por ejemplo para determinar si los efectos se deben a una mecanismo (anti)androgénico.

▼M5

12. Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

13. El bioensayo de Hershberger consigue su sensibilidad utilizando machos con una producción mínima de andrógenos endógenos. Esto se logra mediante el uso de machos castrados, siempre que se deje pasar un plazo razonable tras la castración para que los tejidos diana puedan retroceder a un peso de referencia mínimo y uniforme. De esta manera, cuando se efectúa un cribado de la posible actividad androgénica, se encuentran bajos niveles endógenos de andrógenos circulantes, que el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas es incapaz de compensar por mecanismos de retroalimentación, se maximiza la capacidad de los tejidos para responder, y se minimiza la variabilidad del peso inicial de los tejidos. Cuando se efectúa un cribado de la posible actividad antiandrogénica, puede lograrse un aumento más sistemático del peso de los tejidos a la hora de estimularlos con un andrógeno de referencia. En consecuencia, el bioensayo de Hershberger exige solo 6 animales por grupo de dosis, mientras que en otros ensayos con machos púberes o adultos intactos se sugiere la utilización de 15 animales por grupo de dosis.

14. La castración de las ratas machos peripuberales debe realizarse de manera adecuada, utilizando anestesia y un procedimiento aséptico. Deben administrarse analgésicos en los primeros días tras la operación para eliminar las molestias posquirúrgicas. La castración mejora la precisión del ensayo para detectar andrógenos y antiandrógenos débiles al eliminar los mecanismos compensatorios de retroalimentación endocrina presentes en los animales intactos que pueden atenuar los efectos de los andrógenos y antiandrógenos administrados, y al eliminar la gran variabilidad interindividual de los niveles de testosterona en suero. Por lo tanto, la castración reduce el número de animales necesarios para el cribado de estas actividades endocrinas.

15. Cuando se efectúa un cribado de la posible actividad androgénica, la sustancia problema se administra diariamente por vía oral forzada o por inyección subcutánea durante un período de diez días consecutivos. Las sustancias problema se administran a un mínimo de dos grupos de tratamiento de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo. Tras unas 24 horas después de la administración de la última dosis se procede a realizar la autopsia de los animales. Un aumento estadísticamente significativo en el peso de dos o más órganos diana de los grupos a los que se ha administrado la sustancia problema en comparación con el grupo de control del vehículo indica que dicha sustancia es positiva en cuanto a una posible actividad androgénica (véase el punto 60). Los andrógenos, como la trembolona, que no pueden reducirse en 5α tienen efectos más pronunciados en el EABC y el GP en comparación con el PT, pero todos los tejidos deben mostrar un aumento del crecimiento.

16. Cuando se efectúa un cribado de la posible actividad antiandrogénica, la sustancia problema se administra diariamente por vía oral forzada o por inyección subcutánea durante un período de diez días consecutivos, a la vez que se administran por inyección subcutánea dosis diarias de PT (0,2 o 0,4 mg/kg/d). En el programa de validación se determinó que podía utilizarse tanto una dosis de 0,2 como de 0,4 mg/kg/d de PT, ya que ambas eran eficaces para la detección de antiandrógenos, por lo que solo debía seleccionarse una dosis para el ensayo. La sustancia problema se administra en dosis graduadas a un mínimo de tres grupos de tratamiento de animales de experimentación, a razón de una dosis por grupo. Tras unas 24 horas después de la administración de la última dosis se procede a realizar la autopsia de los animales. Un descenso estadísticamente significativo en el peso de dos o más órganos diana de los grupos a los que se ha administrado la sustancia problema más el PT en comparación con el grupo de control al que solo se ha administrado el PT indica que dicha sustancia es positiva en cuanto a una posible actividad antiandrogénica (véase el punto 61).

▼M5

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de especies y cepas**

17. La rata es la especie utilizada sistemáticamente en el bioensayo de Hershberger desde la década de 1930. Aunque es biológicamente verosímil que tanto la rata como el ratón muestren respuestas similares, tras la experiencia de 70 años con el modelo de la rata se puede afirmar que esta es la especie preferida para el bioensayo de Hershberger. Además, como los datos del bioensayo de Hershberger pueden servir de datos preliminares para un estudio multigeneracional a largo plazo, es posible utilizar en ambos estudios animales de la misma especie, cepa y origen.

18. El presente protocolo permite a los laboratorios seleccionar la cepa de rata que vaya a utilizarse en el ensayo y que, por lo general, debe ser la utilizada habitualmente por el laboratorio participante. Pueden utilizarse cepas de rata de uso común en laboratorios; sin embargo, no deben utilizarse cepas que tarden bastante más de 42 días en madurar, ya que la castración de estos machos a los 42 días puede impedir el pesaje del glande del pene, que solo puede llevarse a cabo después de que el prepucio se haya separado del cuerpo del pene. Así pues, no deben utilizarse cepas de rata derivadas de la Fisher 344, salvo en casos especiales. La rata Fisher 344 tiene un calendario de desarrollo sexual diferente del de otras cepas utilizadas habitualmente, como son la Sprague Dawley o la Wistar (16). Si va a utilizarse dicha cepa, el laboratorio debe castrar los animales a una edad levemente superior y ha de poder demostrar la sensibilidad de la cepa empleada. El laboratorio debe indicar claramente las razones que justifiquen la elección de la cepa de rata. Cuando el ensayo de cribado pueda utilizarse como preliminar para un estudio de la toxicidad oral con administración continuada, para un estudio de la toxicidad para la reproducción y el desarrollo, o para un estudio a largo plazo, deberán utilizarse preferentemente en todos los estudios animales de la misma cepa y del mismo origen.

**Condiciones de alojamiento y alimentación**

19. Todos los procedimientos deben atenerse a todas las normas locales de tratamiento de animales de laboratorio. Estas descripciones de tratamiento y atención de animales constituyen los requisitos mínimos, y quedan anuladas por normas locales de carácter más estricto, tales como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (26). El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (con una oscilación aproximada de ± 3 °C). La humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y de preferencia no exceder del 70 %, salvo durante la limpieza del local. El objetivo debe ser conseguir una humedad relativa del 50-60 %. La iluminación debe ser artificial. La secuencia diaria de iluminación debe ser de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

20. El alojamiento en grupo es preferible al aislamiento, debido a la corta edad de los animales y al hecho de que las ratas son animales sociales. El alojamiento de dos o tres animales por jaula evita el hacinamiento y el estrés que este conlleva y que pueden interferir con el control hormonal del desarrollo de los tejidos sexuales secundarios. Las jaulas deben limpiarse a fondo para eliminar los posibles contaminantes presentes y se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la puesta de los animales en las mismas sean mínimos. Con unas jaulas del tamaño adecuado (~ 2 000 $cm^2$) se evitará el hacinamiento.

21. Cada animal debe identificarse inequívocamente (por ejemplo, etiqueta o marca auricular) utilizando un método incruento. Debe consignarse el método de identificación.

▼M5

22. Debe darse una dieta de laboratorio y agua de bebida *ad libitum*. Los laboratorios que efectúen el bioensayo de Hershberger deben utilizar la dieta que apliquen normalmente en sus tareas de ensayo de sustancias. En los estudios de validación del bioensayo no se observaron efectos ni variabilidad que pudieran atribuirse a la dieta. Se registrará la dieta utilizada y se conservará una muestra de la dieta de laboratorio para posibles futuros análisis.

**Criterios de comportamiento en relación con el peso de los órganos sensibles a los andrógenos**

23. Durante el estudio de validación, no se encontraron indicios de que una disminución del peso corporal afectara incrementando o disminuyendo el aumento del peso de los tejidos diana (es decir, los que deben pesarse en este estudio).

24. Entre las diferentes cepas de rata utilizadas con éxito en el programa de validación, el peso de los órganos sensibles a los andrógenos es mayor en las cepas de rata más pesadas que en las más ligeras. Por tanto, los criterios de comportamiento del bioensayo de Hershberger no incluyen ningún valor absoluto previsto del peso de los órganos de los controles positivos ni de los negativos.

25. Como el coeficiente de variación (CV) de un tejido tiene una relación inversa con la potencia estadística, los criterios de comportamiento del bioensayo de Hershberger se basan en unos valores máximos del CV de cada tejido (cuadro 1). Los CV proceden de los estudios de validación de la OCDE. En caso de resultados negativos, los laboratorios deben examinar los CV del grupo de control y del grupo tratado con la dosis más elevada para determinar si se ha respetado el criterio de comportamiento relativo al CV máximo.

26. El estudio deberá repetirse cuando: 1) tres o más de los diez posibles CV individuales de los grupos de control y de dosis más elevada superen los máximos indicados para los estudios de agonistas y de antagonistas en el cuadro 1, y 2) al menos dos tejidos diana hayan sido marginalmente significativos, es decir, con valores r entre 0,05 y 0,10.

*Cuadro 1*

**CV máximos autorizados para los tejidos sexuales secundarios diana, determinados con el modelo de ratas castradas en los estudios de validación de la OCDE** ([1])**.**

| Tejido | Efectos antiandrogénicos | Efectos androgénicos |
|---|---|---|
| Vesículas seminales | 40 % | 40 % |
| Próstata ventral | 40 % | 45 % |
| EABC | 20 % | 30 % |
| Glándulas de Cowper | 35 % | 55 % |
| Glande del pene | 17 % | 22 % |

([1]) El CV umbral para un determinado tejido se obtuvo a partir de un gráfico de valores de CV —ordenados de menor a mayor de forma secuencial— de todas las medias de todos los experimentos del ejercicio de validación con un modelo específico (agonista o antagonista). El CV umbral se lee en el punto en que los incrementos entre los CV siguientes más elevados de la serie son mucho más grandes que entre los CV anteriores más próximos, es decir, en el «punto de ruptura». Cabe señalar que, aunque este análisis identificó «puntos de ruptura» relativamente fiables en el caso del modelo del ensayo para antagonistas, las curvas de CV en el ensayo para agonistas mostraron un aumento más uniforme, por lo que la identificación de un CV umbral por este método tiene algo de arbitrario en el último caso.

▼M5

PROCEDIMIENTO

**Cumplimiento de la normativa y verificación del laboratorio**

27. A diferencia del ensayo uterotrófico (capítulo B.54 del presente anexo), con el bioensayo de Hershberger no es necesario demostrar la competencia del laboratorio antes del inicio del estudio, ya que se llevan a cabo, como parte integrante del ensayo, controles concurrentes positivos (propionato de testosterona y flutamida) y negativos.

**Número y estado de los animales**

28. Cada grupo tratado y de control debe incluir un mínimo de 6 animales. Esto se aplica a los protocolos tanto con andrógenos como con antiandrógenos.

**Castración**

29. Debe dejarse un período de aclimatación inicial de varios días tras la recepción de los animales a fin de garantizar que estos están sanos y se desarrollan bien. Como es posible que los animales castrados antes de tener 42 días de edad, es decir, antes del día postnatal (DPN) 42, no presenten la separación del prepucio, hay que castrar a los animales el DPN 42 o después, pero no antes. Los animales se castran bajo anestesia haciendo una incisión en el escroto y eliminando ambos testículos y epidídimos, con ligadura de los vasos sanguíneos y de los conductos seminíferos. Tras confirmar que no se está produciendo ninguna hemorragia, ha de cerrarse el escroto con sutura o con autoclips. Durante los primeros días después de la operación, deben administrarse a los animales analgésicos para paliar las molestias debidas a la misma. Si los animales castrados se adquieren de un proveedor de animales, este debe garantizar la edad de los animales y su fase de madurez sexual.

**Aclimatación tras la castración**

30. Los animales deben continuar la aclimatación a las condiciones del laboratorio para que retrocedan los pesos de los tejidos diana, durante un mínimo de 7 días a partir de la castración. Es preciso observar a diario a los animales, y deben suprimirse los animales que presenten signos de enfermedad o anomalías físicas. Por tanto, el tratamiento con la sustancia problema puede comenzar como muy pronto el día DPN 49, y como muy tarde el DPN 60. La edad a la que se efectúa la autopsia no debe superar el DPN 70. Esta flexibilidad permite al laboratorio programar con eficacia las tareas experimentales.

**Peso corporal y aleatorización de los grupos**

31. Las diferencias en el peso corporal de los distintos animales son una fuente de variabilidad de los pesos de los tejidos, tanto dentro de cada grupo como entre los distintos grupos de animales. El aumento de la variabilidad del peso de los tejidos provoca un aumento del coeficiente de variación (CV) y disminuye la potencia estadística del ensayo (a veces denominada sensibilidad del ensayo). Por consiguiente, las variaciones de peso corporal deben estar controladas, tanto de manera experimental como estadística.

32. El control experimental implica que sean pequeñas las variaciones del peso corporal dentro de los grupos de estudio y entre ellos. En primer lugar, deben evitarse los animales excepcionalmente grandes o pequeños y no incluirlos en la cohorte del estudio. Al inicio del estudio, la variación de peso de los animales empleados no debe exceder de ± 20 % del peso medio (por ejemplo, 175g ± 35 g en el caso de las ratas peripuberales castradas). En segundo lugar, los animales deben asignarse a los grupos (tanto de control como de tratamiento) mediante distribución aleatorizada de los pesos, de forma que la media del peso corporal de cada grupo no sea estadísticamente diferente de la de los demás grupos. Debe consignarse debidamente el procedimiento de aleatorización por bloques utilizado.

▼M5

33. Debido a que la toxicidad puede reducir el peso corporal de los grupos tratados en relación con el grupo de control, puede emplearse como covariable estadística el peso corporal en el primer día de la administración de la sustancia problema, en lugar del peso corporal en el momento de la autopsia.

**Posología**

34. Con el fin de establecer si una sustancia problema puede tener acción androgénica *in vivo,* normalmente es suficiente con dos grupos tratados con dicha sustancia y un grupo de control positivo y otro de control negativo (vehículo) (véase el punto 43), por lo que este diseño es el preferido por razones de bienestar de los animales. Si la finalidad es obtener una curva dosis-respuesta o bien extrapolar a dosis más bajas, son necesarios al menos tres grupos tratados. Si hace falta obtener información más allá de la identificación de una actividad androgénica (tal como una estimación de la potencia), debe considerarse una posología diferente. Para hacer un ensayo de antiandrógenos, se administra la sustancia problema junto con un agonista androgénico de referencia. Debe utilizarse un mínimo de 3 grupos de ensayo con dosis diferentes de la sustancia problema, y un control positivo y otro negativo (véase el punto 44). A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del grupo de control deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Si se utiliza un vehículo para la administración de la sustancia problema, el grupo de control debe recibir el mayor volumen de vehículo utilizado con los grupos de ensayo.

35. Todas las dosis deben proponerse y seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente y los datos cinéticos o toxicocinéticos disponibles en relación con la sustancia problema o productos afines. La dosis más alta debe tener en cuenta, en primer lugar, la $DL_{50}$ y la información disponible sobre la toxicidad aguda, a fin de evitar la muerte, el sufrimiento intenso o el malestar de los animales (17)(18)(19)(20) y, en segundo lugar, la información disponible sobre las dosis utilizadas en los estudios de toxicidad crónica y subcrónica. En general, la dosis más alta no debe provocar una reducción del peso corporal final de los animales mayor del 10 % del peso de control. La dosis más alta debe ser o bien 1) la dosis más alta que garantice la supervivencia de los animales y que no implique toxicidad significativa ni malestar para los animales después de 10 días consecutivos de administración de la sustancia hasta una dosis máxima de 1 000 mg/kg/d (véase el punto 36), o bien 2) una dosis que induzca efectos (anti)androgénicos, si esta es inferior. Como ensayo de cribado, es aceptable en general utilizar grandes intervalos entre las distintas dosis, como, por ejemplo, de media unidad logarítmica, correspondiente a un factor de progresión de las dosis de 3,2, o incluso de una unidad logarítmica. Si no se dispone de datos apropiados, puede realizarse un estudio de determinación de la gama de dosis (véase el punto 37), con el fin de ayudar a determinar las dosis convenientes.

**Dosis límite**

36. Si mediante un ensayo con la dosis límite de 1 000 mg/kg de peso corporal al día y con una dosis menor utilizando los procedimientos descritos para el presente estudio no se consigue provocar un cambio estadísticamente significativo del peso de los órganos genitales, puede considerarse que no hace falta aplicar otras dosis diferentes. La dosis límite es aplicable siempre, excepto cuando haya datos de exposición humana que indiquen la necesidad de utilizar una dosis superior.

**Consideraciones para la determinación de la gama de dosis**

37. En caso de necesidad, puede llevarse a cabo con unos pocos animales un estudio previo de determinación de la gama de dosis, a fin de seleccionar los grupos de dosis adecuados [utilizando los métodos de ensayo de la toxicidad aguda (capítulos B.1 *bis,* B.1 *tris* del presente anexo (27), OCDE TG 425 (19))]. El objetivo en el caso del bioensayo de Hershberger es seleccionar las dosis que garanticen la supervivencia y que no impliquen

▼M5

toxicidad significativa ni malestar para los animales después de diez días consecutivos de administración de la sustancia hasta una dosis límite de 1 000 mg/kg/d como se indica en los puntos 35 y 36. A este respecto, puede utilizarse el documento de orientación de la OCDE (17), donde se definen los signos clínicos indicativos de toxicidad o de malestar de los animales. Cuando sea posible en este estudio de determinación de la gama de dosis, tras administrar la sustancia durante diez días, pueden extraerse los tejidos diana y pesarse, una vez hayan transcurrido unas 24 horas desde la administración de la última dosis. Estos datos podrían utilizarse posteriormente para contribuir a la selección de las dosis del estudio principal.

**Sustancias de referencia y vehículo**

38. El agonista androgénico de referencia debe ser el propionato de testosterona (PT), nº CAS 57-82-5. La dosis de referencia del PT puede ser o bien 0,2 mg/kg-pc/d o bien 0,4 mg/kg-pc/d. El antagonista androgénico de referencia debe ser la flutamida (FT), nº CAS 1311-84-7. La dosis de referencia de la FT debe ser 3 mg/kg-pc/d y la FT debe administrarse conjuntamente con la dosis de referencia del PT.

39. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de una solución o suspensión acuosa. Sin embargo, dado que muchos ligandos androgénicos o sus precursores metabólicos tienden a ser hidrófobos, el enfoque más común es el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz, de cacahuete, de sésamo o de oliva). Las sustancias problema pueden disolverse en una cantidad mínima de etanol al 95 % u otro disolvente adecuado, y diluirse en el vehículo del ensayo hasta alcanzar las concentraciones finales de trabajo. Deben conocerse las características tóxicas del disolvente, y este debe someterse a ensayo por separado, en un grupo de control al que se administre solo el disolvente. Si la sustancia problema se considera estable, es posible recurrir a un calentamiento suave y a una acción mecánica vigorosa para ayudar a disolverla. Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo. Si la sustancia problema es estable a lo largo de todo el estudio, puede prepararse una sola alícuota inicial de ella, y después preparar cada día las diluciones especificadas para la administración, con cuidado para evitar la contaminación y el deterioro de las muestras.

**Administración de las dosis**

40. El PT debe administrarse por inyección subcutánea, y la FT por vía oral forzada.

41. La sustancia problema se administra por vía oral forzada o por inyección subcutánea. A la hora de elegir la vía de administración debe considerarse el bienestar de los animales y las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema. Además, deben tenerse en cuenta aspectos toxicológicos como la pertinencia para la vía de exposición humana a la sustancia (por ejemplo, vía oral forzada para simular la ingestión, inyección subcutánea para simular la inhalación o la adsorción cutánea), y la información toxicológica disponible y los datos sobre metabolismo y cinética (por ejemplo, necesidad de evitar el metabolismo de primer paso, mayor eficacia a través de una vía concreta), antes de iniciar amplios ensayos a largo plazo si se obtienen resultados positivos por inyección.

42. Los animales deben recibir las dosis de la misma manera y con la misma secuencia temporal durante diez días consecutivos, con unos intervalos aproximados de 24 horas. El nivel de dosis debe ajustarse diariamente sobre la base de las medidas diarias del peso corporal tomadas de forma paralela. El volumen de las dosis y el momento en que se administren deben registrarse cada día de la exposición. Debe tenerse cuidado de no sobrepasar la dosis máxima descrita en el punto 35, para que se pueda hacer una interpretación significativa de los datos. A este respecto, deben evaluarse a fondo una eventual reducción de peso corporal, la presencia de signos

▼M5

clínicos y otras observaciones. En el caso de la vía oral forzada, debe utilizarse una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse en una sola vez depende del tamaño del animal utilizado. Deben seguirse las normas locales de tratamiento de animales, pero el volumen no debe superar los 5 ml/kg de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, con las que pueden utilizarse 10 ml/kg de peso corporal. En el caso de las inyecciones subcutáneas, las dosis deben administrarse en las regiones dorsoescapular o lumbar con una aguja estéril (por ejemplo, de calibre de 23 o 25 G) y una jeringuilla de tuberculina. Es opcional rasurar el lugar de la inyección. Deben registrarse los eventuales vertidos, las fugas en el punto de inyección o la administración incompleta de la sustancia problema. El volumen total inyectado por rata al día no debe superar los 0,5 ml/kg de peso corporal

**Procedimientos específicos para los agonistas androgénicos**

43. Para el ensayo de agonistas androgénicos, el vehículo es el control negativo y el grupo tratado con PT es el control positivo. La actividad biológica característica de los agonistas androgénicos se somete a ensayo administrando las dosis seleccionadas de la sustancia problema a los grupos de tratamiento durante 10 días consecutivos. Los pesos de los cinco tejidos sexuales secundarios de los grupos a los que se administra la sustancia problema se comparan con los del grupo del vehículo para detectar un eventual aumento estadísticamente significativo del peso.

**Procedimientos específicos para los antagonistas androgénicos y para los inhibidores de la 5α-reductasa**

44. En el ensayo de antagonistas androgénicos y de inhibidores de la 5α-reductasa, el grupo tratado con PT es el control negativo, y el grupo al que se administran conjuntamente las dosis de referencia de PT y de FT es el control positivo. La actividad biológica característica de los antagonistas androgénicos y de los inhibidores de la 5α-reductasa se somete a ensayo administrando una dosis de referencia de PT y la sustancia problema durante 10 días consecutivos. Los pesos de los cinco tejidos sexuales secundarios de los grupos a los que se administra el PT más la sustancia problema se comparan con los del grupo de referencia al que se administra solo el PT para detectar un eventual descenso estadísticamente significativo del peso.

OBSERVACIONES

**Observaciones clínicas**

45. Deben hacerse observaciones clínicas generales al menos una vez al día, y con más frecuencia si se aprecian signos de toxicidad. Las observaciones deben llevarse a cabo preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período previsto de efecto máximo tras la administración. Todos los animales deben observarse para registrar su mortalidad y morbilidad y los signos clínicos generales, tales como cambios en el comportamiento, la piel, el pelo, los ojos, las mucosas, la presencia de secreciones y excreciones, y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.).

46. Todos los animales hallados muertos deben retirarse y eliminarse sin más análisis de los datos. La eventual mortalidad de los animales antes de la autopsia debe incluirse en el registro del estudio, junto con los motivos aparentes de la mortalidad. Los animales moribundos deben sacrificarse de forma compasiva. Los animales que se encuentren moribundos y se sacrifiquen posteriormente deben incluirse en el registro del estudio con los motivos aparentes de la morbilidad.

▼M5

**Peso corporal y consumo de alimentos**

47. Todos los animales deben pesarse diariamente con precisión de 0,1 g, empezando justo antes de que se inicie el tratamiento, es decir, cuando los animales se asignan a los grupos. Con carácter optativo, es posible medir por jaula la cantidad de alimentos consumidos durante el período del tratamiento, pesando los alimentadores. Los resultados del consumo de alimentos deben expresarse en gramos por rata y por día.

**Disección y pesaje de los tejidos y órganos**

48. Aproximadamente 24 horas después de la última administración de la sustancia problema, las ratas deben sacrificarse y desangrarse según los procedimientos normales del laboratorio correspondiente, y debe efectuarse la autopsia. El método de sacrifico compasivo debe registrarse en el informe del laboratorio.

49. Lo ideal es que el orden de la autopsia se aleatorice entre los distintos grupos para evitar una progresión directa de los grupos de más dosis a los de menos (o viceversa), que podría afectar a los datos. Debe registrarse y comunicarse cualquier observación que se haga en la autopsia, es decir, las eventuales alteraciones patológicas o lesiones visibles.

50. Han de pesarse los cinco tejidos sensibles a los andrógenos (PV, VS, EABC, GCW, GP). Estos tejidos deben extraerse y limpiarse cuidadosamente retirando el exceso de tejidos y de grasa adheridos; a continuación se determina su peso fresco (sin fijar). Cada tejido debe manipularse con especial cuidado para evitar la pérdida de líquidos y la desecación, que pueden introducir errores significativos y aumentar la variabilidad al reducir los pesos registrados. Algunos de los tejidos pueden ser muy pequeños o difíciles de extraer, lo que aumenta la variabilidad. Por lo tanto, es importante que las personas que lleven a cabo la disección de los tejidos sexuales secundarios estén familiarizadas con los procedimientos normalizados de esta disección. La OCDE ha publicado un manual de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para la disección (21). Una formación cuidadosa, siguiendo la guía de PNT, reducirá al mínimo esta fuente potencial de variación del estudio. Idealmente, el mismo disector debe encargarse de la disección de un determinado tejido para eliminar las diferencias interindividuales en el tratamiento de los tejidos. Si esto no es posible, la autopsia debe diseñarse de manera que cada disector extraiga un determinado tejido de todos los grupos de tratamiento, en lugar de que una sola persona extraiga todos los tejidos de un grupo de control, mientras que otra persona se encarga de los grupos tratados. Cada uno de los tejidos sexuales secundarios debe pesarse, sin secarse previamente, con precisión de 0,1 mg, y se registran los pesos de cada animal.

51. Algunos de los tejidos pueden ser muy pequeños o difíciles de extraer, lo que aumenta la variabilidad. En trabajos anteriores se ha indicado una banda de coeficientes de variación (CV) que parece diferir según la competencia del laboratorio. En unos pocos casos, se han observado dentro de un mismo laboratorio grandes diferencias en el peso absoluto de tejidos como la PV y las GCW.

52. También pueden pesarse, con carácter opcional, el hígado, la pareja de riñones y la de cápsulas suprarrenales. También estos órganos se deben limpiar para quedar libres del eventual tejido conjuntivo y de la grasa adheridos. El hígado debe pesarse y el resultado registrarse con precisión de 0,1 g, y la pareja de riñones y la de cápsulas suprarrenales con precisión de 0,1 mg. El hígado, los riñones y las cápsulas suprarrenales son sensibles no solo a los andrógenos, sino que también proporcionan indicios útiles sobre la toxicidad sistémica.

▼**M5**

53. Es opcional la medición de la concentración en el suero de la hormona luteinizante (LH), de la hormona foliculoestimulante (FSH) y de la testosterona (T). Los niveles de T en suero son útiles para determinar si la sustancia problema activa el metabolismo hepático de la testosterona, lo que reduciría dichos niveles. Sin los datos de la T, podría parecer que este efecto se debe a un mecanismo antiandrogénico. Los niveles de LH proporcionan información sobre la capacidad de una sustancia antiandrogénica no solo de reducir el peso de los órganos, sino también de afectar a la función hipotalámico-hipofisaria, lo que en estudios a largo plazo puede inducir tumores de testículo. La FSH es una hormona importante para la espermatogénesis. La medición de los niveles en suero de T4 y T3 también es opcional y aporta información suplementaria útil sobre la capacidad de alterar la homeostasis de la hormona tiroidea. Si se van a medir los niveles hormonales, las ratas deben anestesiarse antes de la autopsia y se les toma sangre por punción cardíaca; el método de la anestesia debe seleccionarse con cuidado para que no afecte a la medición hormonal. Deben registrarse el método de preparación del suero, el origen del equipo del radioinmunoanálisis o de otros equipos de medición, los métodos analíticos y los resultados. Los niveles de LH deben indicarse en ng/ml de suero, y la T también debe indicarse en las mismas unidades.

54. La disección de los tejidos se describe a continuación, y se basa en una guía de disección pormenorizada con fotografías, publicada como material suplementario incluido en el programa de validación (21). En la página web del organismo oficial de alimentos y medicamentos de Corea se encuentra también un vídeo sobre la disección (22).

— Con la superficie ventral del animal hacia arriba, se determina si el prepucio se ha separado del glande del pene. En caso positivo, se retrae el prepucio y se extrae el glande del pene, se pesa (con precisión de 0,1 mg) y se registra el peso.

— Se abren la piel y la pared abdominal, exponiendo las vísceras. Si se pesan los órganos opcionales, se extrae el hígado y se pesa con precisión de 0,1 g, se extraen el estómago y los intestinos, se extraen la pareja de riñones y la de cápsulas suprarrenales y se pesan con precisión de 0,1 mg. Esta extracción deja expuesta la vejiga y permite la disección de los tejidos secundarios masculinos diana.

— Para extraer la PV, hay que separar la vejiga de la capa muscular ventral cortando el tejido conjuntivo a lo largo de la línea media. Se desplaza la vejiga hacia adelante, en el sentido de las vesículas seminales (VS), lo que deja a la vista los lóbulos izquierdo y derecho de la próstata ventral (cubiertos por una capa de grasa). Se separa cuidadosamente la grasa de los lóbulos derecho e izquierdo de la PV. Se desplaza suavemente el lóbulo derecho de la PV respecto a la uretra y se separa de esta mediante un corte. Sosteniendo aún el lóbulo derecho de la PV, se desplaza suavemente el lóbulo izquierdo respecto a la uretra y luego se separa mediante un corte; pesar con precisión de 0,1 mg y registrar el peso.

— Para extraer la vesícula seminal con las glándulas coagulantes (VSGC), se desplaza la vejiga hacia la cola, dejando así a la vista los conductos deferentes y los lóbulos derecho e izquierdo de las vesículas seminales más las glándulas coagulantes. Para evitar fugas de líquido se fija una pinza hemostática en la base de la VSGC, donde el conducto deferente se une a la uretra. Se extrae cuidadosamente la VSGC, sin retirar la pinza hemostática se limpia de la grasa y de los elementos anejos, se coloca en una navecilla de pesaje ya tarada, se quita la pinza, se pesa con precisión de 0,1 mg y se registra el peso.

▼M5

— Para extraer el músculo elevador del ano más el músculo bulbocavernoso (EABC), se exponen estos músculos y la base del pene. Los músculos EA envuelven el colon, mientras que los músculos EA anterior y BC se fijan a los bulbos del pene. Se eliminan la piel y los elementos anejos de la región perianal que va desde la base del pene hasta el extremo anterior del ano. Los músculos BC se van cortando gradualmente a partir del bulbo del pene y de los demás tejidos. El colon se corta en dos y así puede diseccionarse y extraerse el conjunto de los EABC. Los EABC deben limpiarse de la grasa y elementos anejos y pesarse con precisión de 0,1 mg; el peso se registra.

— Después de haberse retirado los EABC, pueden verse las glándulas de Cowper redondas o glándulas bulbouretrales (GCW), en la base de los bulbos del pene, en posición ligeramente dorsal. Es necesario prestar atención en la disección para no cortar la fina cápsula y evitar así que se escape el líquido contenido. Pesar la pareja de GCW con precisión de 0,1 mg y registrar el peso.

— Además, debe indicarse si se escapa algún líquido de cualquier glándula durante la autopsia y disección.

55. En caso de que la evaluación de cada sustancia requiera la autopsia de más animales de lo que sea razonable para un solo día, el inicio del estudio podrá escalonarse en dos días consecutivos, con lo que se conseguirá escalonar en dos días la autopsia y el trabajo correspondiente. Al aplicar este escalonamiento, hay que usar cada día la mitad de los animales por grupo de tratamiento.

56. Los cadáveres deben eliminarse de manera adecuada tras la realización de la autopsia.

INFORME DEL ENSAYO

**Datos**

57. Los datos deben notificarse individualmente (es decir, el peso corporal, el peso de los tejidos sexuales secundarios, las mediciones opcionales y las otras respuestas y observaciones) y por cada grupo de animales (las medias y desviaciones típicas de cada medida). Los datos deben resumirse en forma de cuadro y deben indicar el número de animales al comienzo del ensayo, el de los animales encontrados muertos durante el ensayo o encontrados con signos de toxicidad, la descripción de los signos de toxicidad, así como el momento de aparición, la duración y la gravedad.

58. El informe final debe contener lo siguiente:

*Instalaciones de ensayo*

— Nombre de la instalación y ubicación

— Director y demás personal del estudio, con sus responsabilidades en el mismo

— Fechas de inicio y final del estudio, es decir, el primer día de la administración de la sustancia problema y el último día de la autopsia, respectivamente

*Sustancia problema*

— Origen, número de lote, identidad, pureza, dirección completa del proveedor y caracterización de la sustancia o sustancias problema

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas

— Condiciones de almacenamiento y método y frecuencia de la preparación de las diluciones

— Eventuales datos obtenidos sobre la estabilidad

— Eventuales análisis de las soluciones o suspensiones administradas

▼**M5**

*Vehículo*

— Caracterización del vehículo (identidad, proveedor y número de lote)

— Justificación de la elección del vehículo (si es distinto del agua)

*Animales de ensayo y procedimientos de cría de los animales*

— Especie y cepa utilizadas y justificación de la elección

— Origen o proveedor de los animales, con la dirección completa

— Número y edad de los animales proporcionados

— Condiciones de alojamiento (temperatura, iluminación, etc.)

— Dieta (denominación, tipo, proveedor, número de lote, contenido, y, si se conocen, niveles de fitoestrógenos)

— Camas (denominación, tipo, proveedor y contenido)

— Condiciones de alojamiento en las jaulas y número de animales de cada jaula.

*Condiciones del ensayo*

— Edad de los animales en el momento de la castración y duración de la aclimatación una vez castrados

— Peso de cada animal al inicio del estudio (con precisión de 0,1 g)

— Proceso de aleatorización y registro de la asignación a los grupos (de control del vehículo, de referencia, de tratamiento con la sustancia problema) y a las jaulas

— MEDIA y desviación típica de los pesos corporales de cada grupo en cada día de pesaje a lo largo de todo el estudio

— Justificación de la selección de las dosis

— Vía de administración de la sustancia problema y justificación de la elección de la vía de exposición

— Si se trata de un ensayo de antiandrogenicidad, el tratamiento con PT (dosis y volumen)

— Tratamiento con la sustancia problema (dosis y volumen),

— Momento de la administración

— Procedimientos de autopsia, incluidos los medios del desangrado y la eventual anestesia

— Si se efectúan análisis de suero, deben proporcionarse detalles del método. Por ejemplo, si se utiliza el radioinmunoanálisis (RIA), deben recogerse en el informe el procedimiento de RIA, el origen y la fecha de caducidad de los equipos de RIA, el procedimiento para el recuento de centelleo, y la normalización.

*Resultados*

— Observaciones diarias de cada animal durante la administración, incluido lo siguiente:

— Pesos corporales (con precisión de 0,1 g)

— Signos clínicos (en su caso)

— Eventual medición o notas del consumo de alimentos

— Observaciones de la autopsia de cada animal, en particular:

▼M5

— Fecha de la autopsia

— Grupo de tratamiento de los animales

— Código de identificación del animal

— Disector

— Hora del día en que se realizan la autopsia y la disección

— Edad de los animales

— Peso corporal final en la autopsia, con indicación de los eventuales aumentos o disminuciones estadísticamente significativos

— Orden del sangrado y de la disección de los animales en la autopsia

— Pesos de los cinco tejidos diana sensibles a los andrógenos:

— Próstata ventral (con precisión de 0,1 mg)

— Vesículas seminales más glándulas coagulantes, incluidos los líquidos (por parejas, con precisión de 0,1 mg)

— Complejo de músculos elevador del ano y bulbocavernoso (con precisión de 0,1 mg)

— Glándulas de Cowper (peso fresco — por parejas, con precisión de 0,1 mg)

— Glande del pene (peso fresco, con precisión de 0,1 mg)

— Pesos de los tejidos opcionales, si se determinan:

— Hígado (con precisión de 0,1 g)

— Riñones (por parejas, con precisión de 0,1 mg)

— Cápsulas suprarrenales (por parejas, con precisión de 0,1 mg)

— Observaciones generales y comentarios

— Análisis de las hormonas en el suero, si se efectúa:

  — LH en suero (opcional — ng por ml de suero), y

  — T en suero (opcional — ng por ml de suero)

— Observaciones generales y comentarios

*Resumen de los datos*

Los datos deben resumirse en forma de cuadro con el tamaño de la muestra de cada grupo, la media del valor, y el error estándar de la media o la desviación típica. Los cuadros deben incluir los pesos corporales en el momento de la autopsia, los cambios de peso corporal desde el inicio de la administración de la sustancia hasta la autopsia, los pesos de los tejidos sexuales secundarios diana, y los eventuales pesos de órganos opcionales.

*Discusión de los resultados*

**Análisis de los resultados**

59. Los pesos corporales y de los órganos en el momento de la autopsia deben analizarse estadísticamente en relación con características tales como la homogeneidad de la varianza, con las adecuadas transformaciones de datos que puedan ser necesarias. Los grupos de tratamiento deben compararse con un grupo de control, utilizando técnicas tales como la ANOVA, y a continuación deben realizarse comparaciones por parejas (por ejemplo, la prueba unilateral de Dunnett) y aplicarse el criterio de diferencia estadística, por ejemplo, $p \leq 0,05$. Deben señalarse los grupos que alcancen significación estadística. Sin embargo, deben evitarse los pesos «relativos de órganos», debido a las hipótesis estadísticas inválidas en que se basa esta manipulación de datos.

▼**M5**

60. En el caso de los agonistas androgénicos, el control debe ser el grupo de ensayo del vehículo solo. Las características del modo de acción de una sustancia problema pueden dar lugar a diferentes respuestas relativas según los tejidos; por ejemplo, la trembolona, que no puede sufrir la reducción 5-alfa, tiene efectos más pronunciados sobre los EABC y el GP que el PT. Un aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) en los pesos de al menos dos de los cinco tejidos diana sensibles a los andrógenos (PV, EABC, GP, GCW y VSGC) debe considerarse como resultado positivo de acción agonista androgénica, y todos los tejidos diana deben presentar algún grado de aumento del crecimiento. Puede conseguirse una evaluación combinada de todas las respuestas de los tejidos de los órganos sexuales secundarios mediante el adecuado análisis de datos con múltiples variables. Esto podría mejorar el análisis, sobre todo en los casos en que es un único tejido el que da una respuesta estadísticamente significativa.

61. En el caso de los antagonistas androgénicos, el control debe ser el grupo de ensayo del andrógeno de referencia (propionato de testosterona solo). Las características del modo de acción de una sustancia problema pueden dar lugar a diferentes respuestas relativas según los tejidos; por ejemplo, los inhibidores de la 5-alfa-reductasa, como la finasterida, tienen efectos más pronunciados sobre la próstata ventral que sobre otros tejidos, en comparación con antagonistas potentes de los RA, como la flutamida. Una reducción estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en los pesos de al menos dos de los cinco tejidos diana sensibles a los andrógenos (PV, EABC, GP, GCW y VSGC) en comparación con el tratamiento solo con PT debe considerarse como resultado positivo de acción antagonista androgénica, y todos los tejidos diana deben presentar algún grado de reducción del crecimiento. Puede conseguirse una evaluación combinada de todas las respuestas de los tejidos de los órganos sexuales secundarios mediante el adecuado análisis de datos con múltiples variables. Esto podría mejorar el análisis, sobre todo en los casos en que es un único tejido el que da una respuesta estadísticamente significativa.

62. Los datos deben resumirse en forma de cuadro con la media, el error estándar de la media (también podría aceptarse la desviación típica) y el tamaño de la muestra de cada grupo. También deben incluirse cuadros con los datos individuales. Deben examinarse los valores individuales y los valores de la media, el error estándar (o desviación típica) y los CV de los datos de los controles para determinar si cumplen los criterios aceptables de coherencia con los valores históricos previstos. En caso de que los CV hallados superen los valores de los CV del cuadro 1 (véanse los puntos 25 y 26) relativos a los pesos de los distintos órganos, hay que determinar si hay errores en el registro o en la introducción de los datos, o si el laboratorio no domina aún la disección con precisión de los tejidos sensibles a los andrógenos por lo que sería necesario mejorar la formación o práctica. Generalmente, los CV (la desviación típica dividida por el peso medio del órgano) son reproducibles de un laboratorio a otro, y de un estudio a otro. Los datos presentados deben incluir al menos: los pesos de la próstata ventral, de las vesículas seminales, de los músculos elevador del ano y bulbocavernoso, de las glándulas de Cowper, del glande del pene y del hígado, los pesos corporales y la variación del peso corporal desde el inicio de la administración de la sustancia hasta la autopsia. Los datos también pueden presentarse después de haber ajustado la covarianza en función del peso corporal, pero ello no debe sustituir a la presentación de los datos sin ajustar. Además, si no se produce la separación del prepucio en alguno de los grupos, la incidencia de esta separación debe registrarse y compararse estadísticamente con respecto al grupo de control, utilizando la prueba exacta de Fisher.

▼**M5**

63. Al verificar la exactitud de los datos introducidos en el ordenador respecto a las fichas originales de datos, es necesario examinar atentamente los valores de peso de los órganos que no sean biológicamente verosímiles o se separen en más de tres desviaciones típicas de las medias de los grupos de tratamiento, y es posible que tengan que desecharse tales valores, que probablemente sean errores de registro.

64. La comparación de los resultados del estudio con los valores de CV de la OCDE (cuadro 1) suele ser un paso importante en la interpretación en cuanto a la validez de los resultados del estudio. Deben mantenerse en el laboratorio los datos históricos de los grupos de control del vehículo. También deben conservarse en el laboratorio los datos históricos de las respuestas a las sustancias positivas de referencia, tales como el PT y la FT. Los laboratorios pueden también someter a ensayo periódicamente la respuesta a agonistas y antagonistas androgénicos débiles conocidos y conservar esos datos. Dichos resultados pueden compararse con los datos disponibles de la OCDE para garantizar que los métodos del laboratorio proporcionan suficiente precisión y potencia estadísticas.

▼**M5**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Androgénico:** Término utilizado para describir un efecto positivo sobre el crecimiento de los tejidos sensibles a los andrógenos.

**Antiandrogenicidad:** Capacidad de una sustancia de suprimir la acción del PT en un mamífero.

**Sustancia:** Sustancia o mezcla.

**Fecha de nacimiento:** Día postnatal 0.

**Dosis:** Cantidad de sustancia administrada. Para el bioensayo de Hershberger, la dosis se expresa en peso de sustancia problema por unidad de peso corporal del animal sometido al experimento por día (por ejemplo, mg/kg peso corporal al día).

**Posología:** Término general que abarca la dosis administrada, y la frecuencia y duración de la administración.

**Moribundo:** Término utilizado para describir a un animal que está a punto de morir.

**Día postnatal X:** Día nº X de vida a partir de la fecha de nacimiento.

**Sensibilidad:** Capacidad de un método de ensayo para identificar correctamente las sustancias que tienen la propiedad objeto del ensayo.

**Especificidad:** Capacidad de un método de ensayo para identificar correctamente las sustancias que no tienen la propiedad objeto del ensayo.

**Sustancia problema:** Toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

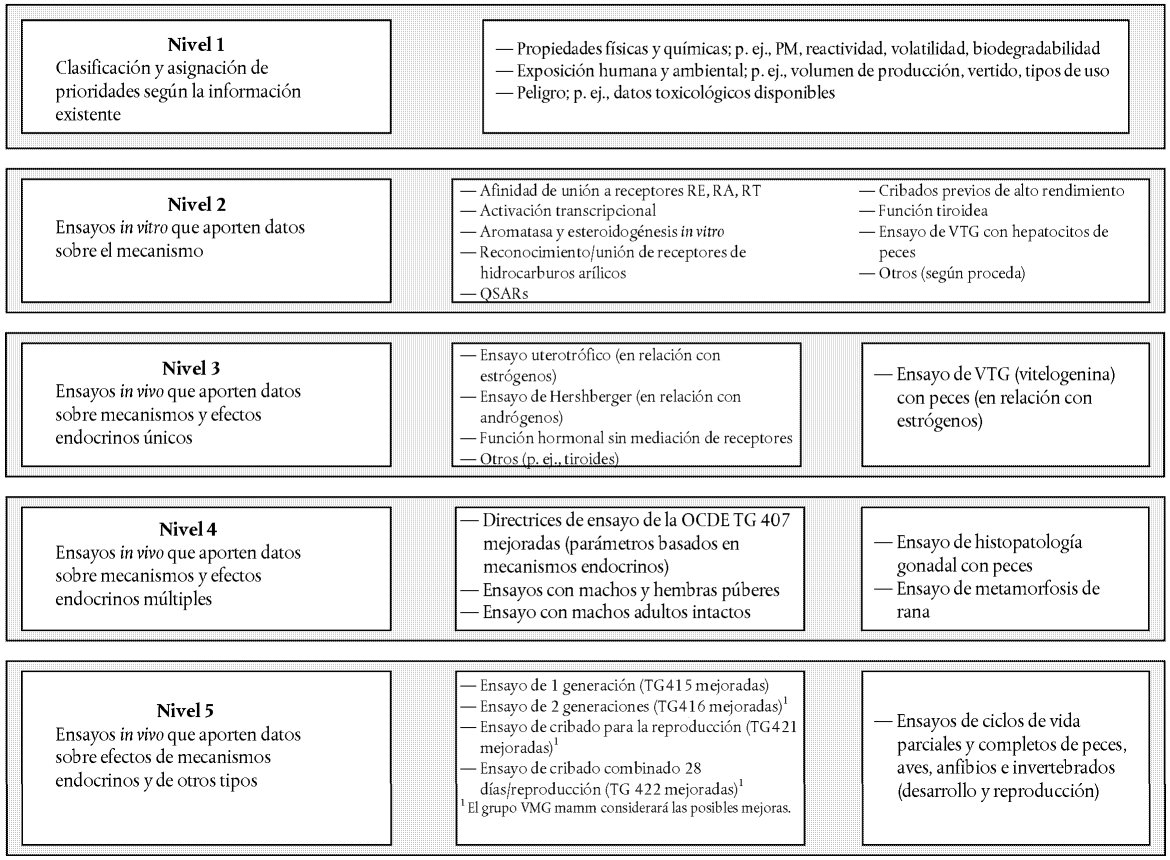
**Validación:** Procedimiento científico diseñado para caracterizar las exigencias y limitaciones operativas de un método de ensayo y demostrar su fiabilidad y pertinencia para un fin particular.

▼M5

*Apéndice 2*

**Nota**: Documento preparado por la Secretaría del programa de directrices de ensayo sobre la base del acuerdo alcanzado en la 6ª reunion del grupo de trabajo sobre el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos

**Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos**




VMG mamm: Grupo de gestión de la validación de ensayos con mamíferos y su evaluación

02008R0440 — ES — 16.10.2019 — 008.001 — 934

▼**M5**

NOTAS RELATIVAS AL MARCO CONCEPTUAL

*Nota 1.* Es posible entrar en el marco y dejarlo en cualquier nivel, en función de la naturaleza de la información que se necesita para la evaluación del peligro y del riesgo.

*Nota 2.* En el nivel 5, la ecotoxicología debe incluir parámetros que indiquen los mecanismos de los efectos adversos y los posibles daños a la población.

*Nota 3.* Cuando un modelo multimodal cubre varios ensayos de un mismo parámetro, este modelo puede sustituir a los ensayos individuales de ese parámetro.

*Nota 4.* La evaluación de cada sustancia debe hacerse caso por caso, teniendo en cuenta toda la información disponible, sin olvidar la función de los niveles del marco conceptual.

*Nota 5.* No debe considerarse que el marco conceptual sea exhaustivo en el momento actual. En los niveles 3, 4 y 5 se incluyen ensayos que están disponibles o cuya validación está en curso. Con respecto a estos últimos, su inclusión tiene carácter provisional. Una vez desarrollados y validados, se inscribirán oficialmente en el marco conceptual.

*Nota 6.* No debe considerarse que el nivel 5 incluya solo ensayos definitivos. Se considera que los ensayos incluidos en este nivel contribuyen a la evaluación general del peligro y del riesgo.

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, $10^{th}$-$11^{th}$ March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

(2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.

(3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. En: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1-16.9.15. J Wiley and Sons Inc.

(4) OCDE (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N$^{o}$ 62. ENV/JM/MONO(2006)30.

(5) OCDE (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Fase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5a-Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N$^{o}$ 86. ENV/JM/MONO(2008)3.

(6) OCDE (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N$^{o}$ 73. ENV/JM/MONO(2007)20.

(7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269.

▼**M5**

(8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. Environ Health Perspect. 115(5):671-8.

(9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. Biochem J26:413-422.

(10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. Biochem J26:1306-1314.

(11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. J Pharmacol Exp Therap 99:38-44.

(12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for mytrophic activity. Endocrinology 45:113-119.

(13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. Proc Soc Exp Biol Med 83:175-180.

(14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic. Washington DC: United States Public Health Service.

(15) Dorfman RI (1969). Androgens and anabolic agents. En: Methods in Hormone Research, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151-220.

(16) Massaro EJ (2002). Handbook of Neurotoxicology, volume I. Nueva York: Humana Press, p. 38.

(17) OCDE (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

(18) OCDE (1982). Organization for Economic Co-operation and Development-Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92-64-12367-9, París.

(19) OCDE (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.

(20) OCDE (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.

(21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Env. Health Persp. 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf.

(22) Korea Food and Drug Administration. Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.

(23) OCDE (2008). Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.

(24) OCDE (2008). Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay.

(25) OCDE (2009). Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼**M5**

(26) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.

(27) Los capítulos siguientes del presente anexo:

B.1 *bis*. Toxicidad oral aguda. Método de dosis fijas

B.1 *ter*. Toxicidad oral aguda. Método de las clases de toxicidad aguda

▼M5

## B.56. ESTUDIO AMPLIADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN EN UNA GENERACIÓN

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 443 (2012). Se basa en la propuesta del comité técnico de evaluación de la seguridad de las sustancias utilizadas en la agricultura (ACSA), del Instituto de Ciencias de la Salud y el Medio ambiente (HESI), del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI), en relación con un estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación $F_1$ sobre distintas fases de la vida, publicado en Cooper *et al.*, 2006 (1). Se han aportado varias mejoras y aclaraciones al diseño del estudio a fin de darle flexibilidad y de hacer hincapié en la importancia de partir de los conocimientos existentes, utilizando al mismo tiempo las observaciones en vivo para orientar y adaptar los ensayos. El presente método de ensayo proporciona una descripción detallada de la realización de un estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación. El método de ensayo describe tres cohortes de animales de la generación $F_1$:

*Cohorte 1:* evalúa parámetros de la reproducción/del desarrollo; esta cohorte puede ampliarse para abarcar una generación $F_2$.

*Cohorte 2:* evalúa el posible impacto de la exposición a la sustancia sobre el desarrollo del sistema nervioso.

*Cohorte 3:* evalúa el posible impacto de la exposición a la sustancia sobre el desarrollo del sistema inmunitario.

2. Las decisiones sobre si procede evaluar la segunda generación y omitir la cohorte de la neurotoxicidad para el desarrollo o la cohorte de la inmunotoxicidad para el desarrollo deben reflejar los conocimientos existentes sobre la sustancia que se va a evaluar, así como las necesidades derivadas de las diversas autoridades normativas. La finalidad del método de ensayo es proporcionar detalles sobre cómo puede realizarse el estudio y tratar sobre cómo hay que evaluar a cada cohorte.

3. En el documento de orientación de la OCDE 117 (39) se describe un procedimiento decisorio sobre el desencadenamiento interno del estudio de la 2ª generación, a la intención de las autoridades normativas que utilizan factores desencadenantes internos.

### Consideraciones iniciales y objetivos

4. El objetivo principal del estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación es evaluar ciertas fases de la vida no cubiertas por otros tipos de estudios de toxicidad y examinar los efectos que se pueden producir como consecuencia de una exposición pre y postnatal a la sustancia. Respecto a los parámetros reproductivos, se prevé que, para detectar los efectos sobre los órganos genitales de machos y hembras, se utilice, como primera etapa y en caso de disponibilidad, la eventual información derivada de estudios con administración continuada [incluidos los ensayos de cribado de la toxicidad para la reproducción, como las TG 422 de la OCDE (32)], o los ensayos de cribado de alteradores endocrinos a corto plazo (por ejemplo, el ensayo uterotrófico -método de ensayo B.54 (36), y el ensayo de Hershberger –método de ensayo B.55 (37). Esto podría incluir la espermatogénesis (histopatología testicular) en los machos y los ciclos estrales, los recuentos foliculares/maduración de ovocitos y la integridad de los ovarios (histopatología) en las hembras. El estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación sirve entonces como ensayo de parámetros reproductores que exigen la interacción de machos con hembras, de las hembras con los productos de la concepción, y de las hembras con la prole y la generación $F_1$ hasta después de la madurez sexual [véase el documento de orientación de la OCDE 151 en apoyo de este método de ensayo (40)].

▼**M5**

5. El presente método de ensayo está diseñado con el objetivo de proporcionar una evaluación de los efectos pre y postnatales de las sustancias sobre el desarrollo, así como una evaluación completa de la toxicidad sistémica en las hembras gestantes y lactantes y en los descendientes jóvenes y adultos. Mediante el examen detallado de los principales parámetros del desarrollo, tales como la viabilidad de la descendencia, la salud neonatal, el grado de desarrollo al nacer y el desarrollo físico y funcional hasta la edad adulta, se espera poder identificar los órganos diana específicos de los descendientes. Además, el estudio debe facilitar o confirmar la información relativa a los efectos de la sustancia problema sobre la integridad y el comportamiento del aparato reproductor de los adultos, tanto machos como hembras. De forma específica, pero sin ánimo de exclusividad, se consideran los parámetros siguientes: función gonadal, ciclo estral, maduración del esperma epididimario, conducta de apareamiento, concepción, gestación, parto y lactancia. Además, la información obtenida de las evaluaciones de la neurotoxicidad para el desarrollo y de la inmunotoxicidad para el desarrollo permitirá caracterizar los efectos potenciales en esos sistemas. Los datos obtenidos de estos ensayos deben permitir la determinación de los niveles sin efectos adversos observados (NOAEL), de los niveles más bajos con efectos adversos observados (LOAEL) o de las dosis de referencia para los diversos parámetros, o utilizarse para caracterizar los efectos detectados en anteriores estudios con administración continuada o servir de orientación para ensayos posteriores.

6. En la figura 1 se muestra un esquema del protocolo. La sustancia problema se administra de manera continua en dosis graduadas a varios grupos de machos y hembras sexualmente maduros. Esta generación parental (P) recibe la sustancia durante un período determinado antes del apareamiento (seleccionado en función de la información disponible sobre la sustancia problema, pero de un mínimo de dos semanas) y durante dos semanas del período de apareamiento. Los machos P se siguen tratando por lo menos hasta el destete de la generación $F_1$. El tiempo mínimo de tratamiento para ellos es de 10 semanas. Pueden tratarse durante más tiempo si es necesario para aclarar los efectos sobre la reproducción. El tratamiento de las hembras P continúa durante la gestación y lactancia hasta su sacrificio tras el destete de las camadas (es decir, 8-10 semanas de tratamiento). A los descendientes $F_1$ se les sigue administrando la sustancia problema desde el destete hasta la edad adulta. Si se evalúa una segunda generación [véase el documento de orientación de la OCDE 117 (39)], la descendencia $F_1$ se mantiene bajo tratamiento hasta el destete de la generación $F_2$, o hasta la terminación del estudio.

7. Se someten todos los animales a observación clínica y examen patológico para detectar signos de toxicidad, insistiendo especialmente en los efectos sobre la integridad y el comportamiento del aparato reproductor de las hembras y de los machos, y sobre la salud, el crecimiento, el desarrollo y la actividad de los descendientes. En el momento del destete, se asignan los descendientes seleccionados a los distintos subgrupos (cohortes 1-3, véanse los puntos 33 y 34 y la figura 1) para efectuar más investigaciones, incluidas las relativas a la maduración sexual, la integridad y el funcionamiento de los órganos sexuales, los parámetros neurológicos y conductuales, y el funcionamiento del sistema inmunitario.

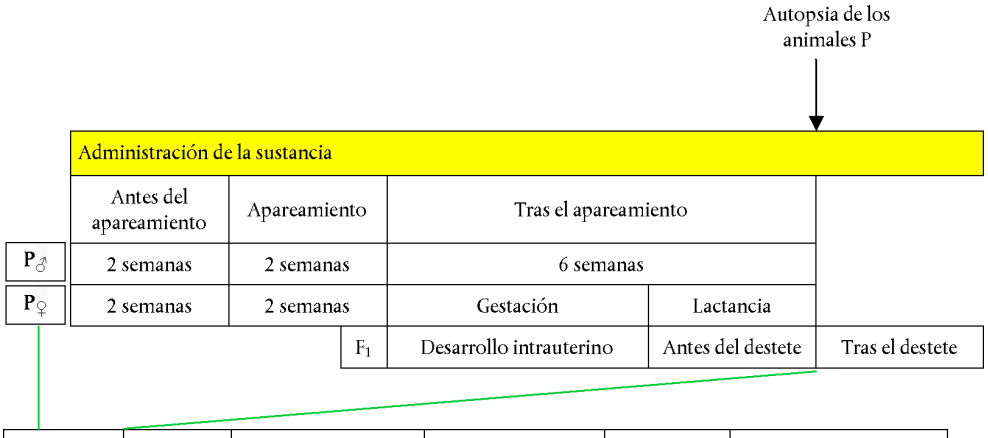
8. Al realizar el estudio, deben aplicarse los principios y consideraciones básicos recogidos en el documento de orientación de la OCDE nº 19 sobre el reconocimiento, evaluación y utilización de los signos clínicos como parámetros de tratamiento compasivo para los animales de experimentación empleados en las evaluaciones de la seguridad (34).

▼M5

9. Cuando se disponga de un número suficiente de estudios para determinar el impacto de este nuevo diseño de estudio, se revisará el método de ensayo y, en caso necesario, se modificará a la luz de la experiencia adquirida.

*Figura 1*

**Esquema del estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación**




| Generación parental | Cohorte | Denominación | Animales/cohorte | Maduración sexual | Edad aproximada en la autopsia (semanas) |
|---|---|---|---|---|---|
| El objetivo es de 20 camadas por grupo. | 1A | Para la reproducción | 20 M + 20 H | Sí | 13 |
| | 1B | Para la reproducción | 20 M + 20 H | Sí | 14 o 20-25 si se activa |
| | 2A | Neurotoxicidad | 10 M + 10 H @ | Sí | 11-12 |
| | 2B | Neurotoxicidad | 10 M + 10 H @ | No | 3 |
| | 3 | Immunotoxicidad | 10 M + 10 H @ | Sí | 8 |
| | Excedente | Reserva | | No | 3 |

@ un animal por camada, con el total representativo de 20 camadas, cuando sea posible

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO/PREPARACIÓN PARA EL ENSAYO

**Animales**

*Selección de la especie y de la cepa de los animales*

10. La elección de la especie empleada en el ensayo de toxicidad para la reproducción tiene que considerarse con detenimiento a la vista de toda la información disponible. Sin embargo, debido a la amplitud de los datos previos y a la comparabilidad con los ensayos de toxicidad general, la rata es normalmente la especie preferida, y los criterios y recomendaciones formulados en el presente método de ensayo se refieren a esta especie. Si se utiliza otra especie, debe justificarse, y será necesario modificar el protocolo. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías espontáneas del desarrollo.

*Edad, peso corporal y criterios de inclusión*

11. Deben utilizarse animales parentales sanos, que no se hayan sometido a experimentos previos. Deben estudiarse tanto machos como hembras, y estas deben ser nulíparas y no gestantes. Los animales P deben ser sexualmente maduros, de peso similar (dentro de cada sexo) al inicio de la administración, de edad similar (de unos 90 días) en el momento del apareamiento, y representativos de la especie y cepa estudiada. Los animales deben aclimatarse durante al menos 5 días después de su llegada. Se asignan aleatoriamente a los grupos de control y de tratamiento de forma que se obtengan unos valores similares de peso corporal medio de los grupos (es decir, con una desviación ± 20 % de la media).

▼M5

*Condiciones de alojamiento y alimentación*

12. El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). La humedad relativa debe encontrarse entre el 30 y el 70 %, siendo ideal el intervalo del 50-60 %. La iluminación, artificial, debe fijarse a una secuencia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Pueden utilizarse dietas convencionales de laboratorio junto con un aporte ilimitado de agua de bebida. Se debe prestar especial atención al contenido en fitoestrógenos de la dieta, ya que un nivel elevado de estos fitoestrógenos podría afectar a algunos parámetros de reproducción. Se recomienda utilizar dietas normalizadas, de composición abierta, en las que se haya reducido el contenido de sustancias estrogénicas (2)(30). La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia problema si se administra por este método. Deben determinarse el contenido, la homogeneidad y la estabilidad de la sustancia problema en las dietas. La comida y el agua de bebida deben analizarse periódicamente para detectar la posible presencia de contaminantes. Deben conservarse en condiciones apropiadas (por ejemplo, congeladas a – 20 °C) muestras de cada lote de la dieta empleada durante el estudio hasta la terminación del informe, por si acaso resultara necesario analizar de nuevo los ingredientes de la dieta.

13. Los animales se deben alojar en jaulas en pequeños grupos del mismo sexo y grupo de tratamiento. Pueden ser alojados individualmente, a fin de evitar posibles daños (por ejemplo, los machos después del período de apareamiento). El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Una vez comprobada la cópula, las hembras que se supone están gestantes se alojan por separado en jaulas de parto o de maternidad, donde se les aporta material de nidificación adecuado y definido. Las camadas se alojan con sus madres hasta el destete. Los animales $F_1$ deben alojarse en pequeños grupos del mismo sexo y grupo de tratamiento desde el destete hasta el sacrificio. Cuando esté científicamente justificado, los animales pueden alojarse individualmente. El nivel de fitoestrógenos contenido en el material de cama seleccionado debe ser mínimo.

*Número e identificación de los animales*

14. Normalmente, cada grupo de ensayo y de control debe contener un número suficiente de parejas para conseguir al menos 20 hembras gestantes por grupo de dosis. El objetivo es conseguir suficientes gestaciones para garantizar una evaluación significativa del potencial de la sustancia problema para afectar a la fertilidad, gestación y comportamiento materno de la generación P, y al crecimiento y desarrollo de los descendientes $F_1$, desde la concepción hasta la madurez. El no conseguir el número deseado de hembras gestantes no invalida necesariamente el estudio y cada caso debe valorarse individualmente, teniendo en cuenta una posible relación causal con la sustancia problema.

15. A cada animal P se le asigna un número de identificación único antes de que se inicie la administración de la sustancia. Si los datos históricos del laboratorio indican la posibilidad de que una proporción significativa de las hembras no presente ciclos estrales regulares (de 4 o 5 días), se aconseja efectuar una evaluación de los ciclos estrales antes del comienzo del tratamiento. También se puede aumentar el tamaño de los grupos para asegurarse de que al menos 20 hembras de cada grupo tienen ciclos estrales regulares (de 4 o 5 días) al inicio del tratamiento. Todos los descendientes $F_1$ se identifican inequívocamente cuando se examinan los neonatos por primera vez el día postnatal (DPN) 0 o 1. A lo largo de todo el estudio debe mantenerse un registro donde se indique la camada de origen de todos los animales de la generación $F_1$, y de la $F_2$ en su caso.

▼M5

**Sustancia problema**

*Información disponible sobre la sustancia problema*

16. El examen de la información existente es importante para tomar decisiones sobre la vía de administración, la elección del vehículo, la selección de la especie animal, la selección de las dosis y las posibles modificaciones del calendario de administración. Por lo tanto, al diseñar el estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación debe tomarse en consideración toda la información disponible sobre la sustancia problema, es decir, sobre sus propiedades fisicoquímicas, toxicocinéticas (incluido el metabolismo específico de la especie) y toxicodinámicas, las relaciones estructura-actividad, los procesos metabólicos *in vitro,* los resultados de anteriores estudios de toxicidad y la información pertinente sobre análogos estructurales. Puede obtenerse información preliminar sobre absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) y bioacumulación a partir de la estructura química, los datos fisicoquímicos, el grado de unión a proteínas plasmáticas o los estudios toxicocinéticos (TC), mientras que los resultados de los estudios de toxicidad dan información adicional, por ejemplo, sobre el NOAEL, el metabolismo o la inducción metabólica.

*Consideración de los datos toxicocinéticos*

17. Aunque no sean obligatorios, los datos TC de los estudios de determinación de la gama de dosis o de otro tipo llevados a cabo previamente son muy útiles para la planificación del diseño del estudio, la selección de las dosis y la interpretación de los resultados. De especial utilidad son los datos que: 1) verifican la exposición de los fetos y crías en desarrollo a la sustancia problema (o a sus metabolitos pertinentes), 2) proporcionan una estimación de la dosimetría interna, y 3) evalúan el potencial de saturación de los procesos cinéticos en función de la dosis. También debe prestarse atención a los datos toxicocinéticos adicionales de que se disponga, tales como perfiles de metabolitos, evolución de la concentración a lo largo del tiempo, etc. Asimismo, pueden recogerse datos toxicocinéticos adicionales durante el estudio principal, siempre que ello no interfiera con la recogida e interpretación de los parámetros principales de dicho estudio.

Como orientación de carácter general, los siguientes conjuntos de datos toxicocinéticos pueden ser útiles en la planificación del estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación:

— Sangre materna y sangre fetal al final de la gestación (por ejemplo, en el día de gestación 20)

— Sangre materna, sangre de las crías y/o leche a mediados del período de lactancia (DPN 10)

— Muestras de sangre de los animales destetados al poco tiempo del destete (por ejemplo, DPN 28).

Debe aplicarse cierta flexibilidad para la determinación de los analitos específicos (por ejemplo, sustancia madre o sus metabolitos) y para el programa de muestreo. Por ejemplo, el número y la hora de la recogida de las muestras en un determinado día de muestreo dependerán de la vía de exposición y del conocimiento previo de las propiedades toxicocinéticas de los animales no gestantes. En el caso de los estudios que implican administración con los alimentos, una única muestra tomada a la misma hora cada día puede ser suficiente, mientras que si la administración se hace por vía oral forzada puede estar justificado el muestreo en momentos adicionales para obtener una mejor estimación de la gama de dosis internas. Sin embargo, no es necesario generar una curva completa de concentración-tiempo para cada día de muestreo. En caso necesario, se puede agrupar la sangre por sexos dentro de las camadas para los análisis fetales y neonatales.

▼**M5**

*Vía de administración*

18. La selección de la vía debe tener en cuenta la vía o vías más pertinentes para la exposición humana. Aunque el protocolo está diseñado para la administración de la sustancia problema con la dieta, puede modificarse para contemplar la administración por otras vías (agua de bebida, vía oral forzada, inhalación, a través de la piel) en función de las características de la sustancia y de la información requerida.

*Elección del vehículo*

19. En caso necesario, la sustancia problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda que, siempre que sea posible, se considere en primer lugar el uso de una solución o suspensión acuosa, y solo después el de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz). Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Debe evitarse la utilización de vehículos con potencial de toxicidad intrínseca (por ejemplo, acetona, DMSO). Debe determinarse la estabilidad de la sustancia problema en el vehículo. Debe prestarse atención a las siguientes características si se utiliza un vehículo u otro aditivo para facilitar la administración de la sustancia problema: los efectos sobre la absorción, distribución, metabolismo o retención de dicha sustancia; los efectos sobre las propiedades químicas de la sustancia problema que puedan modificar sus características de toxicidad; y los efectos sobre el consumo de alimentos y agua o sobre el estado nutricional de los animales.

*Selección de las dosis*

20. Normalmente, el estudio debe incluir al menos tres dosis y un control en paralelo. A la hora de seleccionar los niveles adecuados de dosis, el investigador ha de considerar toda la información disponible, incluida la información sobre dosis procedente de estudios anteriores, los datos toxicocinéticos de animales gestantes o no gestantes, la medida de la transferencia por la leche y las estimaciones de la exposición humana. Si se dispone de datos toxicocinéticos que indiquen saturación de los procesos toxicocinéticos en función de la dosis, debe tenerse cuidado para evitar niveles altos de dosis que provoquen claramente la saturación, siempre, por supuesto, que la exposición humana prevista esté bastante por debajo del punto de saturación. En tales casos, la dosis más alta debe estar en el punto de inflexión de la transición a un comportamiento toxicocinético no lineal, o justo ligeramente por encima de dicho punto.

21. En ausencia de datos toxicocinéticos pertinentes, las dosis deben basarse en los efectos tóxicos, a menos que las características fisicoquímicas de la sustancia problema impongan alguna limitación. Si las dosis se basan en la toxicidad, la dosis más alta debe seleccionarse con el propósito de inducir ciertos efectos de toxicidad sistémica, pero sin llegar a provocar la muerte ni un sufrimiento intenso de los animales.

22. Debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis con el fin de demostrar la existencia de una eventual relación del efecto con la dosis y de establecer los niveles sin efecto adverso observado (NOAEL), o las dosis cerca del límite de detección que permitan la determinación de una dosis de referencia para el parámetro o parámetros más sensibles. Para evitar grandes separaciones entre los NOAEL y los LOAEL, suele ser adecuado un intervalo del doble o cuádruple. A menudo es preferible añadir un cuarto grupo de ensayo antes que utilizar un intervalo muy grande entre dosis (por ejemplo, con un factor superior a 10).

23. A excepción de la administración de la sustancia problema, los animales del grupo de control deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Este grupo de control no debe recibir tratamiento, o recibir un placebo, o ser un grupo de control del vehículo si este se utiliza para administrar la sustancia. En este caso, el grupo de control ha de recibir el mayor volumen de vehículo que se haya utilizado.

▼M5

*Ensayo límite*

24. Es posible que no sea necesario llevar a cabo un estudio con varias dosis diferentes si no hay indicios de toxicidad a una dosis de al menos 1 000 mg/kg de peso corporal al día en estudios con administración continuada, o si no se prevé que haya toxicidad según los datos sobre sustancias relacionadas estructural o metabólicamente, que indiquen similitud en las propiedades metabólicas *in vivo/in vitro*. En tales casos, el estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación puede efectuarse con un grupo de control y una sola dosis de al menos 1 000 mg/kg de peso corporal al día. Sin embargo, en caso de que con esta dosis límite se encuentren indicios de toxicidad para la reproducción o para el desarrollo, será necesariollevar a cabomás estudios a dosis menores para determinar un NOAEL. Estas consideraciones sobre el ensayo límite son aplicables solo cuando la exposición humana no indique la necesidad de utilizar una dosis superior.

PROCEDIMIENTOS

**Exposición de la descendencia**

25. La exposición alimentaria es el método preferido de administración. Si se realizan ensayos por vía oral forzada, debe tenerse en cuenta que normalmente las crías reciben la sustancia problema solo indirectamente a través de la leche materna, hasta que se inicie la administración directa tras el destete. En los estudios en que la sustancia problema se mezcla con los alimentos o el agua de bebida, las crías también la reciben directamente cuando empiezan a alimentarse solas en la última semana de lactancia. Debe estudiarse la conveniencia de modificar el diseño del estudio cuando la excreción de la sustancia problema en la leche sea escasa y cuando no haya pruebas de una exposición continua de los descendientes. En estos casos, debe considerarse la administración directa de la sustancia a las crías durante la lactancia, según la información disponible sobre toxicocinética, toxicidad para la progenie o cambios en los biomarcadores (3)(4). Antes de realizar estudios de administración directa de la sustancia a las crías lactantes, deben considerarse cuidadosamente sus ventajas e inconvenientes (5).

**Calendario y administración de las dosis**

26. A partir de estudios anteriores de toxicidad con administración continuada de una duración adecuada puede conseguirse cierta información sobre los ciclos estrales, la histopatología de los aparatos reproductores masculinos y femeninos, y el análisis del esperma testicular o epididimario. Por lo tanto, la duración del tratamiento antes del apareamiento en el estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación tiene como objetivo la detección de efectos sobre los cambios funcionales que pueden interferir con la conducta de apareamiento y la fertilización. El tratamiento antes del apareamiento debe ser lo bastante largo para lograr unas condiciones estables de exposición en los machos y hembras P. En la mayoría de los casos se considera adecuado un período de 2 semanas de tratamiento antes del apareamiento para ambos sexos. En el caso de las hembras, esto incluye 3-4 ciclos estrales completos y debe ser suficiente para detectar cualquier efecto adverso sobre dichos ciclos. En los machos, esto equivale al tiempo necesario para el tránsito epididimario de los espermatozoides en maduración y debe permitir la detección de los efectos post-testiculares en el esperma (durante las fases finales de la espermiogénesis y la maduración espermática en el epidídimo) sobre el apareamiento. En el momento del sacrificio, cuando están programados el estudio de la histopatología testicular y epididimaria y el análisis de los parámetros del esperma, los machos P y $F_1$ se habrán expuesto durante al menos un ciclo de espermatogénesis completo (6)(7)(8)(9); véase también el documento de orientación de la OCDE 151 (40).

▼M5

27. Las situaciones de exposición de los machos antes del apareamiento pueden modificarse si en estudios anteriores se han identificado claramente toxicidad testicular (alteración de la espermatogénesis) o efectos sobre la integridad y la función del esperma. Del mismo modo, en el caso de las hembras, pueden justificarse diferentes situaciones de exposición antes del apareamiento si se conoce algún efecto de la sustancia problema sobre el ciclo estral y, por tanto, sobre la receptividad sexual. En casos especiales puede ser aceptable que el tratamiento de las hembras P no comience hasta haberse obtenido un frotis con presencia de esperma [véase el documento de orientación de la OCDE 151 (40)].

28. Una vez establecido el período de tratamiento antes del apareamiento, se administra a los animales la sustancia problema a un ritmo de 7 días por semana, de forma continua hasta la autopsia. Todos los animales deben recibir la sustancia de la misma manera. La administración de la sustancia debe continuar durante el período de apareamiento de 2 semanas y, en el caso de las hembras P, a lo largo de la gestación y lactancia hasta el día del sacrificio, después del destete. Los machos deben tratarse de la misma manera, hasta su sacrificio en el momento en que se desteten los animales de la generación $F_1$. Para la autopsia, debe darse prioridad a las hembras cuya autopsia ha de realizarse en el mismo día de lactancia, o en uno similar. La autopsia de los machos puede repartirse a lo largo de un número mayor de días, en función de las instalaciones del laboratorio. A menos que ya se haya iniciado durante la lactancia, la administración directa a los machos y hembras seleccionados de la generación $F_1$ debe comenzar en el destete y proseguir hasta la autopsia prevista, dependiendo de la cohorte asignada.

29. En el caso de sustancias administradas con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades de sustancia problema administradas no interfieren con la nutrición normal ni con el equilibrio hídrico. Cuando la sustancia problema se administre con el alimento, se puede utilizar una concentración alimentaria constante (ppm) o bien una dosis constante por unidad de peso corporal de los animales; debe especificarse la opción elegida.

30. Cuando la sustancia problema se administre por vía oral forzada, el volumen de líquido administrado no debe en principio exceder de 1 ml/100 g peso corporal (o de 0,4 ml/100 g peso corporal en caso de aceite como, por ejemplo, aceite de maíz). Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis. El tratamiento debe administrarse todos los días a una hora similar. La dosis que se administra a cada animal debe calcularse normalmente con arreglo a la última determinación de su peso corporal y ajustarse al menos una vez por semana en los machos adultos y en las hembras adultas no gestantes, y cada dos días en las hembras gestantes y en los animales de la generación $F_1$ cuando se administre antes del destete y durante las dos semanas siguientes a este. Si los datos indican una baja transferencia placentaria de la sustancia problema, puede ser necesario ajustar la dosis administrada por vía oral forzada en la última semana de gestación para evitar que sea excesivamente tóxica para la madre. El día del parto, las hembras no deben recibir la sustancia por vía oral forzada, ni por cualquier otra vía de tratamiento que exija la manipulación del animal; es preferible no administrar la sustancia problema ese día antes que perturbar el proceso del parto.

▼M5

**Apareamiento**

31. Cada hembra P debe ponerse con un solo macho sin parentesco con ella, seleccionado al azar, del mismo grupo de tratamiento (emparejamiento 1:1) hasta que se observen signos de cópula o hayan pasado 2 semanas. Si es insuficiente el número de machos, por ejemplo debido a mortalidad masculina antes del apareamiento, es posible emparejar con una segunda hembra (1:1) a machos que se hayan apareado antes con otra, de forma que se emparejen todas las hembras. El día 0 de la gestación se define como el día en que se confirman los signos de apareamiento (se observa la presencia de un tapón vaginal o de esperma). Los animales deben separarse tan pronto como sea posible, una vez observados los signos del apareamiento. Si no ha habido apareamiento al cabo de 2 semanas, los animales deben separarse sin darles más oportunidades para aparearse. Las parejas deben quedar claramente identificadas en los resultados.

**Tamaño de la camada**

32. El día 4 tras el nacimiento, puede adaptarse el tamaño de cada camada mediante la eliminación por selección aleatoria de las crías sobrantes para obtener, en la medida de lo posible, cinco machos y cinco hembras por camada. No es apropiada la eliminación selectiva de las crías, por ejemplo en función del peso corporal. Cuando el número de crías machos y hembras impida lograr que cada camada cuente con cinco de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (por ejemplo, seis machos y cuatro hembras).

**Selección de las crías para los estudios tras el destete (véase la figura 1)**

33. En el momento del destete (alrededor del DPN 21) se seleccionan para su examen posterior crías de todas las camadas disponibles, hasta 20 por grupo de tratamiento y de control, y se conservan hasta su madurez sexual (salvo que se tengan que someter a ensayo antes). Las crías se seleccionan aleatoriamente, con la salvedad de que no se incluirán los animales con retraso evidente (animales con un peso corporal que se encuentre más de dos desviaciones típicas por debajo del peso medio de las crías de la camada respectiva), dado que es poco probable que sean representativos del grupo de tratamiento.

El DPN 21, las crías $F_1$ seleccionadas se asignan aleatoriamente a una de las tres cohortes siguientes:

Cohorte 1 (1A y 1B) = ensayo de toxicidad para la reproducción o el desarrollo

Cohorte 2 (2A y 2B) = ensayo de neurotoxicidad para el desarrollo

Cohorte 3 = ensayo de inmunotoxicidad para el desarrollo

Cohorte 1A: Un macho y una hembra por camada y grupo (20/sexo/grupo): selección prioritaria para la evaluación primaria de efectos sobre los aparatos reproductores y de la toxicidad general.

Cohorte 1B: Un macho y una hembra por camada y grupo (20/sexo/grupo): selección prioritaria para la posterior evaluación del comportamiento reproductor apareando animales $F_1$, en su caso [véase el documento de orientación de la OCDE 117 (39)], y para obtener datos adicionales de histopatología en caso de que se sospeche que la sustancia es tóxica para la reproducción o para el sistema endocrino, o cuando los resultados de la cohorte 1A sean dudosos.

Cohorte 2A: Un total de 20 crías por grupo (10 machos y 10 hembras por grupo; un macho o una hembra por camada) asignadas para el ensayo neuroconductual seguido de la evaluación de la neurohistopatología como adultos.

Cohorte 2B: Un total de 20 crías por grupo (10 machos y 10 hembras por grupo; un macho o una hembra por camada) asignadas para la evaluación de la neurohistopatología en el momento del destete (DPN 21 o 22). Si es insuficiente el número de animales, debe darse preferencia a la asignación de animales a la cohorte 2A.

▼M5

Cohorte 3: Un total de 20 crías por grupo (10 machos y 10 hembras por grupo; un animal por camada, en la medida de lo posible). Puede ser necesario disponer de más crías del grupo de control para que actúen como animales de control positivo en el ensayo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T (TDAR) en el DPN 56 ± 3.

34. En caso de que sea insuficiente el número de crías de una camada para cubrir todas las cohortes, tendrá prioridad la cohorte 1, ya que puede ampliarse para producir una generación $F_2$. Pueden asignarse crías adicionales a cualquiera de las cohortes en caso de preocupación específica, por ejemplo si se sospecha que una sustancia es neurotóxica, inmunotóxica o tóxica para la reproducción. Estas crían podrán utilizarse para exámenes en diferentes momentos o para la evaluación de parámetros adicionales. En las crías no asignadas a ninguna cohorte se estudiará la bioquímica clínica (punto 55) y se someterán a autopsia macroscópica (punto 68).

**Segundo apareamiento de los animales P**

35. No se recomienda normalmente un segundo apareamiento para los animales P, ya que implica la pérdida de información importante sobre el número de puntos de implantación (y, por tanto, de datos de muerte postimplantación y perinatal, indicadores de un eventual potencial teratogénico) de la primera camada. La necesidad de comprobar o aclarar un efecto en las hembras expuestas se puede satisfacer mejor ampliando el estudio para incluir un apareamiento de la generación $F_1$. Sin embargo, un segundo apareamiento de los machos P con hembras sin tratar es siempre una opción para aclarar resultados dudosos o para caracterizar mejor los efectos sobre la fertilidad observados en el primer apareamiento.

OBSERVACIONES EN VIVO

**Observaciones clínicas**

36. Con los animales P y con los $F_1$ seleccionados, se hace una observación clínica general una vez al día. En caso de administración por vía oral forzada, el momento de las observaciones clínicas debe ser antes y después de la administración de la sustancia (para detectar posibles signos de toxicidad asociados con la concentración plasmática máxima). Se registran los cambios pertinentes en el comportamiento, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad. Dos veces al día, y una vez al día durante los fines de semana, todos los animales se observan para detectar los casos de toxicidad grave, morbilidad y mortalidad.

37. Además, semanalmente se efectúa un examen más detallado de todos los animales P y $F_1$ (tras el destete); puede hacerse coincidiendo con una ocasión en que se pesen los animales, lo que reduciría al mínimo el estrés de la manipulación. Las observaciones deben llevarse a cabo cuidadosamente y registrarse utilizando sistemas de puntuación que hayan sido definidos por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas. Los signos anotados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, la presencia de secreciones y excreciones y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala). Deben registrarse también los cambios observados en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipias (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza, recorridos repetitivos en círculo) o comportamientos anómalos (por ejemplo, automutilación, marcha hacia atrás).

▼M5

**Peso corporal y consumo de alimento y agua**

38. Los animales P se pesan el día de la primera administración y a continuación al menos una vez por semana. Además, las hembras P se pesan durante la lactancia, los mismos días en que se pesen las crías de sus camadas (véase el punto 44). Todos los animales $F_1$ se pesan individualmente el día del destete (DPN 21) y a continuación al menos una vez por semana. El peso corporal se registra también el día en que el animal alcanza la pubertad (finalización de la separación del prepucio o permeabilidad vaginal). Todos los animales se pesan en el momento del sacrificio.

39. Durante el estudio, se registra el consumo de alimentos y agua (en el caso de la administración de la sustancia problema con el agua de bebida) al menos una vez por semana, los mismos días en que se determinan los pesos corporales de los animales (excepto durante la cohabitación). El consumo de alimentos de cada jaula de animales $F_1$ se registra semanalmente, empezando en el momento de la asignación a la cohorte respectiva.

**Ciclos estrales**

40. Puede disponerse de información preliminar sobre efectos en el ciclo estral relacionados con la sustancia, procedente de estudios de toxicidad con administración continuada, y esa información puede utilizarse en el diseño de un protocolo del estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación que sea específico de la sustancia problema. Normalmente la evaluación de los ciclos estrales (por citología vaginal) empezará al principio del período de tratamiento y proseguirá hasta la confirmación del apareamiento o el final del período de apareamiento de 2 semanas. Si las hembras se han sometido a ensayo de cribado para comprobar que tienen ciclos estrales normales antes del tratamiento, es útil continuar haciendo frotis desde el inicio del tratamiento, pero si hay alguna preocupación en cuanto a posibles efectos inespecíficos al comienzo del tratamiento (como una reducción inicial significativa del consumo de alimentos), es posible dejar a los animales que se adapten al tratamiento durante un máximo de dos semanas antes de empezar el período de recogida de frotis de dos semanas que precede al emparejamiento. Si el período de tratamiento de las hembras se amplía de esta manera (es decir, hasta cuatro semanas de tratamiento previo al apareamiento) se debería considerar la adquisición de animales más jóvenes y la ampliación del período de tratamiento de los machos antes del emparejamiento. La toma de células vaginales o cervicales ha de hacerse con cuidado para no dañar la mucosa y evitar una pseudogestación (10)(11).

41. Deben examinarse diariamente los frotis vaginales de todas las hembras $F_1$ de la cohorte 1A, tras el inicio de la permeabilidad vaginal, hasta que se registre el primer frotis cornificado, para determinar el intervalo de tiempo entre estos dos acontecimientos. También deben supervisarse los ciclos estrales de todas las hembras $F_1$ de la cohorte 1A durante dos semanas, a partir del DPN 75, aproximadamente. Por otra parte, si fuera necesario aparear la generación $F_1$, se supervisará la citología vaginal de la cohorte 1B desde el momento del emparejamiento hasta que se observen signos de apareamiento.

**Apareamiento y gestación**

42. Además de los parámetros normales (por ejemplo, peso corporal, consumo de alimentos, observaciones clínicas, incluidos los controles de mortalidad/morbilidad), se registrarán las fechas de emparejamiento, de inseminación y de parto, y se calcularán el intervalo precoital (entre el emparejamiento y la inseminación) y la duración de la gestación (de la inseminación al parto). Las hembras P deben examinarse atentamente en el momento previsto del parto para detectar posibles signos de distocia. Deberán registrarse las eventuales anomalías observadas en la conducta de nidificación o de lactación.

▼M5

43. El día en que se produce el parto es el día 0 de la lactancia (DL 0) para la madre y el día postnatal (DPN 0) para la descendencia. Alternativamente, todas las comparaciones pueden basarse también en el tiempo postcoital para eliminar la confusión en los datos de desarrollo postnatal debida a diferencias en la duración de la gestación; sin embargo, también deberá registrarse el calendario en relación con el parto. Esto es especialmente importante si la sustancia problema ejerce alguna influencia sobre la duración de la gestación.

**Parámetros de los descendientes**

44. Se examinan todas las camadas lo antes posible después del parto (DPN 0 o 1) para determinar el número y sexo de las crías, la mortinatalidad, el número de nacidos vivos y la presencia de anomalías macroscópicas (anomalías visibles externamente, incluido el paladar hendido; las hemorragias subcutáneas; las anomalías en el color o la textura de la piel; la presencia de cordón umbilical; la falta de leche en el estómago; la presencia de secreciones secas). Además, el primer examen clínico de los recién nacidos debe incluir una evaluación cualitativa de la temperatura corporal, del estado de actividad y de la reacción a la manipulación. Las crías halladas muertas el DPN 0 o posteriormente deben examinarse para detectar posibles anomalías y determinar la causa de la muerte. Las crías vivas se cuentan y se pesan individualmente el DPN 0 o el DPN 1, y periódicamente a continuación como, por ejemplo, al menos los DPN 4, 7, 14 y 21. Los exámenes clínicos, según proceda en función de la edad de los animales, deben repetirse cuando se pesen los descendientes, o más a menudo si en el momento del nacimiento ha habido observaciones específicas. Los signos anotados pueden incluir, sin ánimo de exhaustividad, las anomalías externas, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, la presencia de secreciones y excreciones y la actividad neurovegetativa. Deben registrarse también los cambios observados en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipias o comportamientos anómalos.

45. Debe medirse la distancia anogenital (DAG) de cada cría, al menos en una ocasión entre el DPN 0 y el DPN 4. El peso corporal de las crías debe recogerse el día en que se mida la DAG y esta DAG se debe normalizar en función de una medida del tamaño de las crías, de preferencia la raíz cúbica del peso corporal (12). Debe comprobarse la presencia de pezones/areolas en las crías macho el DPN 12 o 13.

46. Todos los animales $F_1$ seleccionados se evalúan diariamente en cuanto a la separación balano-prepucial o la permeabilidad vaginal, según sean machos o hembras, respectivamente, comenzando antes de la fecha prevista para la aparición de dichos signos, a fin de detectar si se produce una maduración sexual precoz. Deben anotarse las eventuales anomalías de los órganos genitales, tales como la hebra vaginal persistente, la hipospadia o el pene hendido. La madurez sexual de los animales $F_1$ se compara con el desarrollo físico mediante la determinación de la edad y del peso corporal en el momento de la separación balano-prepucial o de la apertura de la vagina, según se trate de machos o hembras, respectivamente.

**Evaluación de la posible neurotoxicidad para el desarrollo (cohortes 2A y 2B)**

47. Deben utilizarse para la evaluación de la neurotoxicidad los diez machos y diez hembras de la cohorte 2A y los diez machos y diez hembras de la cohorte 2B, de cada grupo de tratamiento (para cada cohorte: 1 macho o 1 hembra por camada; todas las camadas representadas por un mínimo de 1 cría; con selección aleatoria). Los animales de la cohorte 2A deben someterse al ensayo de sobresalto acústico, a la batería de observaciones funcionales, y a la evaluación de la actividad motriz (véanse los puntos 48-50) y de la neuropatología (véanse los puntos 74-75). Debe procurarse que las

▼M5

variaciones en todas las condiciones de ensayo sean mínimas y no estén relacionadas sistemáticamente con el tratamiento. Entre las variables que pueden afectar al comportamiento se encuentran el nivel sonoro (por ejemplo, ruido intermitente), la temperatura, la humedad, la iluminación, los olores, la hora del día y las distracciones del entorno. Los resultados de los ensayos de neurotoxicidad deben interpretarse en relación con las bandas de referencia adecuadas de los controles históricos. Los animales de la cohorte 2B deben utilizarse para la evaluación de la neuropatología el DPN 21 o 22 (véanse los puntos 74-75).

48. El DPN 24 (± 1 día) debe llevarse a cabo un ensayo de sobresalto acústico con los animales de la cohorte 2A. El día del ensayo deben compensarse los grupos de tratamiento y de control. Cada sesión consiste en 50 pruebas. Al realizar el ensayo de sobresalto acústico, debe determinarse la amplitud de la respuesta media de cada bloque de 10 pruebas (5 bloques de 10 pruebas), con las condiciones de ensayo optimizadas para lograr la habituación dentro de la sesión. Estos procedimientos deben ser compatibles con el método de ensayo B.53 (35).

49. En un momento adecuado entre el DPN 63 y el DPN 75, los animales de la cohorte 2A se someten a una batería de observaciones funcionales y a un ensayo automatizado de la actividad motriz. Estos procedimientos deben ser compatibles con los métodos de ensayo B.43 (33) y B.53 (35). La batería de observaciones funcionales incluye una descripción detallada del aspecto, del comportamiento y de la integridad funcional del animal. La evaluación se efectúa mediante observaciones en la jaula de alojamiento, después de trasladar al animal a un ámbito normalizado de observación (campo abierto) donde pueda moverse libremente, y mediante pruebas de manipulación. Los ensayos deben graduarse desde el menos hasta el más interactivo. En el apéndice 1 se presenta una lista de medidas. Todos los animales deben ser observados cuidadosamente por observadores cualificados que no conozcan la situación de los animales respecto al tratamiento, utilizando procedimientos normalizados para reducir al mínimo la variabilidad del observador. En la medida de lo posible, es conveniente que el mismo observador evalúe a los animales en un ensayo determinado. Si esto no es posible, hay que demostrar la fiabilidad inter-observadores. Para cada parámetro de la batería de ensayos de comportamiento deben emplearse escalas y criterios de puntuación explícitos, definidos desde el punto de vista operativo. Si es posible, deben elaborarse medidas cuantitativas objetivas para los parámetros de observación, que implican una clasificación subjetiva. Para la actividad motriz, cada uno de los animales se somete a ensayo individualmente. La sesión de ensayo debe ser lo suficientemente larga para demostrar la habituación de los controles dentro de la sesión. La actividad motriz debe supervisarse con un aparato automático de registro de la actividad, que debe ser capaz de detectar tanto los aumentos como los descensos de la misma (es decir, la actividad de referencia medida por el dispositivo no debe ser tan baja que no se puedan detectar los eventuales descensos, ni tan elevada que no se puedan detectar los eventuales aumentos de la actividad). Cada dispositivo debe comprobarse mediante procedimientos estándar para garantizar, en la medida de lo posible, la fiabilidad del funcionamiento con diferentes dispositivos y en diferentes días. En la medida de lo posible, los grupos tratados deben repartirse de forma equilibrada entre los distintos dispositivos. Los grupos tratados deben equilibrarse en cuanto a los momentos del ensayo a fin de evitar confusiones debidas a los ritmos circadianos de actividad.

50. Si existe información que indique la necesidad de hacer otras pruebas funcionales (por ejemplo, sensitivas, sociales, cognitivas), estas deben integrarse sin comprometer la integridad de las otras evaluaciones efectuadas en el estudio. Si estas pruebas se realizan con los mismos animales utilizados para hacer el ensayo de sobresalto acústico, la batería de observaciones funcionales y el ensayo de actividad motriz, deben programarse los ensayos diferentes de forma que se reduzca al mínimo el riesgo de comprometer la integridad de dichos ensayos. Puede ser especialmente útil realizar procedimientos complementarios cuando la observación empírica, los efectos previstos o el mecanismo o modo de acción indiquen un tipo determinado de neurotoxicidad.

▼M5

**Evaluación de la posible inmunotoxicidad para el desarrollo (cohorte 3)**

51. El día DPN 56 (± 3 días), los 10 machos y 10 hembras de la cohorte 3 procedentes de cada grupo de tratamiento (1 macho o 1 hembra por camada; todas las camadas representadas por un mínimo de 1 cría; con selección aleatoria) deben utilizarse en un ensayo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T, es decir, la respuesta primaria de anticuerpos IgM a un antígeno dependiente de linfocitos T, como los eritrocitos de oveja (SRBC) o la hemocianina de la lapa californiana (KLH), de acuerdo con los actuales procedimientos de ensayo de la inmunotoxicidad (14)(15). La respuesta puede evaluarse mediante el recuento de células que forman calvas específicas (PFC) en el bazo o por la determinación del título de anticuerpos de tipo IgM específicos de KLH o de SRBC en el suero mediante ELISA, en el máximo de la respuesta. Las respuestas, por lo general, presentan un máximo a los cuatro (PFC) o cinco (ELISA) días después de la inmunización por vía intravenosa. Si la respuesta primaria de anticuerpos se comprueba mediante el recuento de células que forman calvas, es posible evaluar subgrupos de animales en días distintos, siempre que: la inmunización y el sacrificio del subgrupo se programen de manera que las PFC se cuenten en el máximo de la respuesta; que los subgrupos contengan un número igual de descendientes machos y hembras de todos los grupos de dosis, incluidos los controles; y que los subgrupos se evalúen a aproximadamente la misma edad postnatal.La exposición a la sustancia problema continuará hasta el día antes de recoger los bazos para ver la respuesta de PFC o el suero para la prueba ELISA.

**Evaluación complementaria de la posible toxicidad para la reproducción (cohorte 1B)**

52. Los animales de la cohorte 1B pueden mantenerse en tratamiento después del DPN 90 y criarse para obtener una generación $F_2$ en caso necesario. Deben cohabitar machos y hembras del mismo grupo de dosis (evitando el emparejamiento de hermanos) durante un período de hasta dos semanas, empezando como pronto el DPN 90, pero sin exceder del DPN 120. Los procedimientos deben ser similares a los de los animales P. Sin embargo, basándose en la ponderación de las pruebas, puede bastar si se sacrifican las camadas el DPN 4 en lugar de mantenerlas hasta el destete o incluso después.

OBSERVACIONES FINALES

**Bioquímica clínica y hematología**

53. Deben supervisarse los efectos sistémicos en los animales P. En el sacrificio se toman muestras de sangre en ayunas, de un lugar definido, de diez machos y hembras P seleccionados al azar, por grupo de dosis; estas muestras se conservan en condiciones adecuadas y se someten a un examen parcial o completo de hematología, bioquímica clínica, ensayo de T4 y TSH, o a otros exámenes sugeridos por el perfil conocido de efectos de la sustancia problema [véase el documento de orientación de la OCDE 151 (40)]. Deben examinarse los siguientes parámetros hematológicos: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento total y diferencial de leucocitos, recuento de plaquetas y potencial/tiempo de coagulación. Entre las investigaciones en plasma o suero deben figurar las siguientes: glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales, albúmina y al menos dos enzimas indicadoras de efectos hepatocelulares (tales como la alanina-aminotransferasa, la aspartato-aminotransferasa, la fosfatasa alcalina, la gamma-glutamil-transpeptidasa y la sorbitol-deshidrogenasa). La determinación de otras enzimas y de ácidos biliares puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias. Además, es posible extraer sangre de todos los animales y almacenarla para realizar eventuales análisis en un momento posterior con el fin de clarificar efectos dudosos o para generar datos de exposición interna. Si no se contempla un segundo apareamiento entre los animales P, las muestras de sangre se obtienen justo antes del procedimiento del sacrificio previsto, o como parte del mismo. En el caso de que se mantengan en vida los animales, las muestras de

▼M5

sangre deben recogerse unos días antes de que se apareen por segunda vez. Salvo que haya datos de estudios con administración continuada que indiquen que el parámetro no se ve afectado por la sustancia problema, debe efectuarse un análisis de orina antes del sacrificio y hay que evaluar los parámetros siguientes: aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, contenido en proteínas, glucosa, sangre y células sanguíneas, y restos celulares. También puede recogerse la orina para supervisar la excreción de la sustancia problema o de sus metabolitos.

54. También deben supervisarse los efectos sistémicos en los animales $F_1$. En el sacrificio se toman muestras de sangre en ayunas, de un lugar definido, de diez machos y hembras de la cohorte 1A seleccionados al azar, por grupo de dosis; estas muestras se conservan en condiciones adecuadas y se someten a un examen de bioquímica clínica normal, incluida la evaluación de los niveles en suero de las hormonas tiroideas (T4 y TSH), yde hematología (recuento total y diferencial de leucocitos y recuento de eritrocitos), así como a un análisis de orina.

55. El excedente de crías se somete a autopsia macroscópica el DPN 4 y se sopesa la medición de las concentraciones de la hormona tiroidea (T4) en el suero. En caso necesario, puede agruparse la sangre de los neonatos (DPN 4) por camadas para los análisis bioquímicos o de la hormona tiroidea. También se recoge sangre para los análisis de T4 y TSH de los animales destetados que se someten a autopsia macroscópica el DPN 22 (crías $F_1$ no seleccionadas para las cohortes).

**Parámetros del esperma**

56. Los parámetros del esperma deben medirse en todos los machos de la generación P, salvo que se disponga de datos que indiquen que tales parámetros no se ven afectados en un estudio de 90 días. El examen de los parámetros del esperma debe realizarse con todos los machos de la cohorte 1A.

57. En el momento del sacrificio se registran los pesos de los testículos y epidídimos de todos los machos P y $F_1$ (cohorte 1A). Al menos un testículo y un epidídimo se reservan para el examen histopatológico. Los epidídimos restantes se utilizan para el recuento de las reservas de esperma de la cola del epidídimo (16)(17). Además, se recoge el esperma de la cola del epidídimo (o del conducto deferente) utilizando métodos que reduzcan al mínimo las alteraciones para la evaluación de la motilidad y morfología de los espermatozoides (18).

58. La movilidad del esperma puede evaluarse inmediatamente después del sacrificio o grabarse para su posterior análisis. El porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles puede determinarse de forma subjetiva u objetiva mediante el análisis del movimiento con ayuda de ordenador (19)(20)(21)(22)(23)(24). Para la evaluación de la morfología de los espermatozoides, debe examinarse una muestra de esperma epididimario (o del conducto deferente) como preparación fijada o en fresco (25) y hay que clasificar al menos 200 espermatozoides por muestra como normales (tienen normales tanto la cabeza y el segmento medio como la cola) o anormales. Las anomalías morfológicas de los espermatozoides incluyen las fusiones, las cabezas aisladas y las cabezas o las colas deformes (26). La presencia de cabezas deformes o grandes puede indicar alteraciones de la espermiogénesis.

59. Si se congelan muestras de esperma, se fijan los frotis y se graban imágenes para el análisis de la movilidad del esperma en el momento de la autopsia (27), es posible limitar los análisis posteriores a los machos de control y a los que han recibido la dosis alta. No obstante, si se observan efectos relacionados con el tratamiento, también deben evaluarse los grupos que han recibido las dosis inferiores.

▼M5

**Autopsia macroscópica**

60. En el momento del sacrifico o de la muerte prematura, todos los animales P y $F_1$ se someten a autopsia y a examen macroscópico para detectar los eventuales cambios patológicos o anomalías estructurales. Se prestará especial atención a los órganos genitales. Deben registrarse las crías moribundas que se sacrifiquen por métodos compasivos y las crías muertas, y, si no están descompuestas, deben examinarse para detectar posibles anomalías y establecer la causa de la muerte, y conservarse posteriormente.

61. En el caso de las hembras adultas P y $F_1$, se examina el día de la autopsia un frotis vaginal para determinar la fase del ciclo estral y poder establecer una correlación con la histopatología de los órganos genitales. Los úteros de todas las hembras P (y de las hembras $F_1$, si procede) se examinan para detectar la posible presencia de puntos de implantación y contar su número, de una manera que no comprometa la evaluación histopatológica.

**Pesaje de los órganos y conservación de los tejidos — animales adultos P y $F_1$**

62. En el momento del sacrificio, se determinan el peso corporal y el peso húmedo de los órganos enumerados a continuación (lo antes posible tras la disección a fin de evitar su desecación) de todos los animales P y de todos los adultos $F_1$, de las cohortes pertinentes, como se indica a continuación. Estos órganos deben conservarse posteriormente en condiciones adecuadas. A menos que se especifique lo contrario, los órganos pares pueden pesarse por separado o combinados, de forma coherente con la práctica habitual del laboratorio correspondiente.

— Útero (con oviductos y cuello), ovarios

— Testículos, epidídimos (totales y colas de las muestras utilizadas en los recuentos de esperma)

— Próstata (partes dorsolateral y ventral combinadas). Hay que extremar el cuidado cuando se cortan los tejidos adherentes del complejo de la próstata para evitar la perforación de las vesículas seminales llenas de líquido. En caso de efectos sobre el peso total de la próstata relacionados con el tratamiento, deben separarse cuidadosamente los segmentos dorsolateral y ventral, previa fijación, y pesarse aparte.

— Vesículas seminales con las glándulas coagulantes y sus líquidos (como una sola unidad)

— Encéfalo, hígado, riñones, corazón, bazo, timo, hipófisis, glándula tiroidea (tras su fijación), cápsulas suprarrenales y órganos o tejidos diana conocidos.

63. Además de los órganos enumerados anteriormente, deben conservarse, en condiciones adecuadas, muestras de los nervios periféricos, músculos, médula espinal, ojos más nervio óptico, tubo digestivo, vejiga urinaria, pulmón, tráquea (con las glándulas tiroidea y paratiroideas), médula ósea, conducto deferente (machos), glándula mamaria (machos y hembras) y vagina.

64. Todos los órganos de los animales de la cohorte 1A se pesarán y se conservarán para su estudio histopatológico.

65. Para la investigación de los efectos inmunotóxicos inducidos antes y después del nacimiento, 10 machos y 10 hembras de la cohorte 1A de cada grupo de tratamiento (1 macho o 1 hembra por camada; todas las camadas representadas por un mínimo de 1 cría; con selección aleatoria) serán objeto de lo siguiente:

— pesaje de los ganglios linfáticos asociados con la vía de exposición y distantes de ella (además del pesaje de las cápsulas suprarrenales, el timo y el bazo, ya realizado en todos los animales de la cohorte 1A),

▼M5

— análisis de las subpoblaciones de linfocitos esplénicos (linfocitos T CD 4+ y CD 8+, linfocitos B y linfocitos citolíticos naturales), utilizando la mitad del bazo, ya que la otra mitad se reserva para la evaluación histopatológica.

El análisis de las subpoblaciones de linfocitos esplénicos en animales no inmunizados (cohorte 1A) determinará si la exposición está relacionada con un cambio de la distribución en el equilibrio inmunológico de los linfocitos derivados del timo «cooperadores» (CD 4+) o citotóxicos (CD 8+) o de los linfocitos citolíticos naturales (respuestas rápidas a las células neoplásicas y a los patógenos).

66. De los animales de la cohorte 1B deben pesarse los órganos siguientes, y los tejidos correspondientes se preparan en tacos de biopsia:

— Vagina (no pesada)

— Útero con cuello

— Ovarios

— Testículos (por lo menos uno)

— Epidídimos

— Vesículas seminales y glándulas coagulantes

— Próstata

— Hipófisis

— Órganos diana identificados.

El estudio de histopatología de la cohorte 1B se llevará a cabo si los resultados de la cohorte 1A son dudosos o si se sospecha que la sustancia es tóxica para la reproducción o para el sistema endocrino.

67. Cohortes 2A y 2B: Ensayo de neurotoxicidad para el desarrollo (DPN 21 o DPN 22 y descendientes adultos). Los animales de la cohorte 2A se sacrifican tras los ensayos de comportamiento, se registra el peso de su encéfalo y se hace un estudio completo de neurohistopatología con fines de evaluación de la neurotoxicidad. Los animales de la cohorte 2B se sacrifican el DPN 21 o el DPN 22, se registra el peso de su encéfalo y se hace un examen microscópico del encéfalo con fines de evaluación de la neurotoxicidad. La fijación por perfusión es obligatoria para los animales de la cohorte 2A y opcional para los de la cohorte 2B, como se contempla en el método de ensayo B.53 (35).

**Pesaje de los órganos y conservación de los tejidos — animales destetados $F_1$**

68. Las crías que no se hayan seleccionado para las cohortes, incluidos los animales con retraso, se sacrifican tras el destete, el DPN 22, salvo que los resultados indiquen la necesidad de continuar las investigaciones en vivo. Las crías sacrificadas se someten a autopsia macroscópica, incluida una evaluación de los órganos genitales, como se describe en los puntos 62 y 63. Se pesarán y conservarán en condiciones adecuadas el encéfalo, el bazo y el timo de hasta 10 crías por sexo y por grupo, del máximo de camadas posible. Además, podrán conservarse para su análisis microscópico posterior los tejidos mamarios de estas crías machos y hembras ([1]) [véase el documento de orientación de la OCDE 151 (40)]. Deben conservarse las anomalías macroscópicas y los tejidos diana para un posible examen histológico.

([1]) La investigación realizada ha puesto de manifiesto que la glándula mamaria, especialmente su desarrollo durante las primeras fases de la vida, constituye un parámetro sensible de la acción de los estrógenos. Se recomienda incluir en el presente método de ensayo, tras la validación, parámetros relativos a las glándulas mamarias de ambos sexos.

▼M5

**Examen de histopatología — animales P**

69. Se lleva a cabo un examen completo de histopatología de los órganos enumerados en los puntos 62 y 63 procedentes de todos los animales P de los grupos de dosis alta y de control. También deben examinarse los órganos que muestren cambios relacionados con el tratamiento, procedentes de todos los animales de los grupos tratados con las dosis inferiores, para ayudar a determinar el NOAEL. Además de ello, se someterán a evaluación histopatológica los órganos genitales de todos los animales en los que se sospeche una disminución de la fertilidad como, por ejemplo, los que no se hayan apareado, no hayan concebido, no hayan engendrado o no hayan tenido una progenie sana, o en los que se hayan observado alteraciones del ciclo estral o de la cantidad, movilidad o morfología de los espermatozoides, así como todas las lesiones macroscópicas.

**Examen de histopatología — animales $F_1$**

*Animales de la cohorte 1*

70. Se lleva a cabo un examen completo de histopatología de los órganos enumerados en los puntos 62 y 63 procedentes de todos los animales adultos de la cohorte 1A de los grupos de dosis alta y de control. Todas las camadas deben estar representadas por un mínimo de 1 cría por sexo. También deben examinarse los órganos y tejidos que muestren cambios relacionados con el tratamiento y todas las lesiones macroscópicas de todos los animales de los grupos tratados con las dosis inferiores para ayudar a determinar el NOAEL. Para la evaluación de los efectos inducidos antes y después del nacimiento sobre los órganos linfáticos, debe procederse también al examen de la histopatología de los ganglios linfáticos y de la médula ósea recogidos de 10 machos y 10 hembras de la cohorte 1A, además de la evaluación histopatológica del timo, el bazo y las cápsulas suprarrenales, ya realizada con todos los animales de la cohorte 1A.

71. Si se sospecha que la sustancia es tóxica para la reproducción o para el sistema endocrino, se efectuará el examen de la histopatología de los tejidos genitales y endocrinos de todos los animales de la cohorte 1B, preparados en tacos de biopsia como se describe en el punto 66. Si los resultados de la cohorte 1A son dudosos, también deberá someterse a examen histopatológico la cohorte 1B.

72. Los ovarios de las hembras adultas deben contener folículos primordiales y en crecimiento, así como cuerpos lúteos; por lo tanto, el examen histopatológico debe estar orientado a la evaluación cuantitativa de los folículos primordiales y de los pequeños folículos en crecimiento, así como de los cuerpos lúteos, en las hembras $F_1$; el número de animales, la elección de la sección ovárica y el tamaño de la muestra de lasección han de ser adecuados desde el punto de vista estadístico para el procedimiento de evaluación empleado. El recuento folicular puede realizarse en primer lugar con los animales de control y con los que han recibido la dosis máxima y, en caso de que se observe un efecto adverso en los últimos, realizarse entonces con los animales de las dosis más bajas. En el examen debe hacerse el recuento de los folículos primordiales, que pueden estar combinados con los pequeños folículos en crecimiento, para efectuar la comparación de los ovarios de las hembras de los grupos tratados y los del grupo de control [véase el documento de orientación de la OCDE 151 (40)]. La evaluación de los cuerpos lúteos debe efectuarse en paralelo con el ensayo de los ciclos estrales, de forma que en la evaluación pueda tenerse en cuenta la fase del ciclo. Se examinan el oviducto, el útero y la vagina, en cuanto al desarrollo correcto de cada órgano.

73. Se realizan exámenes histopatológicos detallados de los testículos de los machos $F_1$ a fin de detectar efectos relacionados con el tratamiento sobre la diferenciación y el desarrollo de los testículos y sobre la espermatogénesis (38). Cuando sea posible, deben examinarse secciones de la red testicular. Se examinan la cabeza, el cuerpo y la cola del epidídimo y el conducto deferente en cuanto al desarrollo correcto de cada órgano, así como en cuanto a los parámetros requeridos para los machos P.

▼M5

*Animales de la cohorte 2*

74. Se hace una evaluación de la neurohistopatología de todos los animales de la cohorte 2A de los grupos de dosis alta y de control, por sexo, tras haberse realizado los ensayos neuroconductuales (después del DPN 75, pero sin sobrepasar el DPN 90). Se hace un examen de la histopatología del encéfalo de todos los animales de la cohorte 2B de los grupos de dosis alta y de control, por sexo, el DPN 21 o el DPN 22. También deben examinarse los órganos o tejidos que muestren cambios relacionados con el tratamiento, procedentes de todos los animales de los grupos tratados con las dosis inferiores para contribuir a determinar el NOAEL. Se examinan secciones múltiples del encéfalo de los animales de las cohortes 2A y 2B, para evaluar los bulbos olfativos, la corteza cerebral, el hipocampo, los núcleos basales, el tálamo, el hipotálamo, el mesencéfalo (techo, tegmento y pedúnculos cerebrales), el tronco encefálico y el cerebelo. Se examinan los ojos (retina y nervio óptico) y muestras de los nervios periféricos, músculos y médula espinal, solo de los animales de la cohorte 2A. Todos los procedimientos neurohistológicos deben ser compatibles con el método de ensayo B.53 (35).

75. Deben llevarse a cabo evaluaciones morfométricas (cuantitativas) de zonas representativas del encéfalo (secciones homólogas cuidadosamente seleccionadas en función de puntos de referencia microscópicos fiables) y pueden incluir mediciones lineales o de superficies de regiones específicas del encéfalo. Al nivel de cada punto de referencia deben hacerse al menos tres secciones consecutivas para seleccionar la sección más homóloga y representativa de la zona específica del encéfalo que deba evaluarse. El neuropatólogo debe aplicar su juicio para decidir si las secciones preparadas para la medición son homólogas de otras del conjunto de la muestra y, por tanto, adecuadas para incluirse, ya que las mediciones lineales en particular pueden cambiar dentro de una distancia relativamente corta (28). No deben utilizarse secciones que no sean homólogas. Aunque el objetivo sea tomar muestras de todos los animales reservados con tal fin (10/sexo/dosis), puede ser válido también un número inferior. Sin embargo, a efectos del presente método de ensayo no se considerará en general suficiente que las muestras procedan de menos de 6 animales/sexo/dosis. Puede utilizarse la estereología para identificar efectos relacionados con el tratamiento sobre parámetros tales como el volumen o el número de células de determinadas regiones neuroanatómicas. Todos los aspectos de la preparación de las muestras de tejido, desde la fijación de los tejidos hasta la disección de las muestras de tejido, el tratamiento de los tejidos y la tinción de las preparaciones microscópicas, deben seguir un diseño equilibrado de forma que cada lote contenga muestras representativas de cada grupo de dosis. Cuando vayan a aplicarse análisis morfométricos o estereológicos, el tejido del encéfalo debe incluirse en el medio apropiado al mismo tiempo para todos los niveles de dosis, a fin de evitar artefactos por retracción asociados con una conservación prolongada en el fijador.

INFORMES

**Datos**

76. Los datos se facilitan por separado y se resumen en forma de cuadro. Cuando proceda, de cada grupo de ensayo y cada generación, debe indicarse lo siguiente: el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales encontrados muertos durante el ensayo o sacrificados por razones compasivas, la fecha y la hora de las eventuales muertes o sacrificios compasivos, el número de animales fértiles, el número de hembras gestantes, el número de hembras que paren una camada, y el número de animales que muestran signos de toxicidad. Debe recogerse también una descripción de la toxicidad, con inclusión del momento de la aparición, la duración y la gravedad.

77. Los resultados numéricos deben evaluarse mediante un método estadístico adecuado y aceptado. Los métodos estadísticos deben elegirse en la fase de diseño del estudio y deben tratar de forma adecuada los datos no normales (por ejemplo, los datos de los recuentos), los datos no considerados (p, ej., debido a un tiempo de observación limitado), la falta de independencia (por ejemplo, efectos de camada y repetición de medidas), y las varianzas desiguales. Los modelos mixtos lineales generalizados y los modelos de

▼M5

dosis-respuesta cubren una amplia categoría de instrumentos analíticos que pueden ser adecuados para los datos generados con arreglo al presente método de ensayo. El informe debe recoger información suficiente sobre el método de análisis y el programa informático empleados, de manera que un revisor o estadístico independiente pueda evaluar o reevaluar el análisis.

**Evaluación de los resultados**

78. Los resultados deben evaluarse en términos de efectos observados, incluyendo las observaciones microscópicas y las de la autopsia. La evaluación incluye la relación, o la ausencia de relación, entre la dosis y la presencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluidas las lesiones macroscópicas. También deben evaluarse los órganos diana, la fertilidad, las anomalías clínicas, el comportamiento reproductor y con la prole, los cambios de peso corporal, la mortalidad y demás efectos tóxicos y sobre el desarrollo. Debe prestarse especial atención a los cambios específicos de un sexo. A la hora de evaluar los resultados del ensayo deben tenerse en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema y, si están disponibles, los datos toxicocinéticos, incluidas la transferencia placentaria y la excreción en la leche.

**Informe del ensayo**

79. El informe del ensayo debe incluir la siguiente información obtenida en el presente estudio de los animales P, $F_1$ y $F_2$ (si procede):

*Sustancia problema:*

— Toda la información pertinente de que se disponga sobre las propiedades químicas, toxicocinéticas y toxicodinámicas de la sustancia problema;

— Datos de identificación;

— Pureza;

*Vehículo (si procede):*

— Justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua;

*Animales de experimentación:*

— Especie y cepa utilizada;

— Número, edad y sexo de los animales;

— Procedencia, condiciones de alojamiento, dieta, material de nidificación, etc.;

— Peso de cada animal al inicio del ensayo;

— Datos de los frotis vaginales de las hembras P antes del inicio del tratamiento (si se han recogido datos en ese momento);

— Registros del emparejamiento de la generación P que indiquen el macho y la hembra de un apareamiento y si este ha tenido éxito;

— Registros de la camada de origen de los adultos de la generación $F_1$;

*Condiciones del ensayo:*

— Justificación de la selección de las dosis;

— Datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos y concentración obtenida;

▼M5

— Estabilidad y homogeneidad del preparado en el vehículo o portador (por ejemplo, alimentos, agua de bebida), en la sangre o en la leche, en las condiciones de utilización y almacenamiento entre utilizaciones;

— Datos sobre la administración de la sustancia problema;

— Conversión de la concentración (ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida a la dosis alcanzada (mg/kg peso corporal y por día), si procede;

— Detalles de la calidad de los alimentos y del agua (incluida la composición de la dieta, si se conoce);

— Descripción detallada de los procedimientos de aleatorización en la selección de crías para su eliminación y para su asignación a los grupos de ensayo;

— Condiciones ambientales;

— Lista del personal del estudio, incluida su formación profesional.

*Resultados (resumen y datos individuales por sexo y dosis):*

— Consumo de alimentos, consumo de agua si se ha medido, rendimiento alimentario (ganancia de peso corporal por gramo de alimentos consumidos, salvo durante el período de cohabitación y la lactancia), y consumo de la sustancia problema (en caso de administración con los alimentos o el agua de bebida) de los animales P y $F_1$;

— Datos relativos a la absorción (si se dispone de ellos);

— Datos de peso corporal de los animales P;

— Datos sobre el peso corporal de los animales $F_1$ seleccionados tras el destete;

— Fecha de las muertes sobrevenidas durante el estudio o si los animales han sobrevivido hasta el sacrificio;

— Naturaleza, gravedad y duración de los signos clínicos (reversibles o no);

— Datos de los análisis hematológicos, de orina y de química clínica, incluidas las hormonas TSH y T4;

— Análisis fenotípico de las células del bazo (linfocitos T, linfocitos B, linfocitos citolíticos naturales);

— Estudio de las células de la médula ósea;

— Datos de la respuesta tóxica;

— Número de hembras P y $F_1$ con ciclo estral normal y anormal y duración del ciclo;

— Tiempo del apareamiento (intervalo precoital, que es el número de días entre emparejamiento y apareamiento);

— Efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, incluidos los números y porcentajes de los animales que han llevado a cabo el apareamiento, la gestación, el parto y la lactancia, de los machos que han provocado una gestación, de las hembras con signos de distocia o parto difícil o prolongado;

— Duración de la gestación y, si se dispone de este dato, del parto;

— Número de implantaciones, tamaño de la camada y porcentaje de crías machos;

— Número y porcentaje de pérdidas postimplantación, de nacidos vivos y de mortinatos;

▼M5

— Datos del peso de la camada y del peso de las crías (machos, hembras y combinados), el número de animales con retraso si se ha determinado;

— Número de crías con anomalías visibles macroscópicamente;

— Efectos tóxicos o de otro tipo sobre la progenie, el crecimiento postnatal, la viabilidad, etc.;

— Datos sobre puntos de referencia físicos evaluados en las crías y otros datos relativos al desarrollo postnatal;

— Datos sobre la maduración sexual de los animales $F_1$;

— Datos sobre las observaciones funcionales realizadas en las crías y los adultos, según proceda;

— Peso corporal en el momento del sacrificio y peso absoluto y relativo de los órganos de los animales P y de los adultos $F_1$;

— Observaciones de la autopsia;

— Descripción detallada de todas las observaciones histopatológicas;

— Número total de espermatozoides en la cola del epidídimo, porcentaje de espermatozoides progresivamente móviles, porcentaje de espermatozoides de morfología normal y porcentaje de espermatozoides con cada anomalía detectada, correspondientes a los machos P y $F_1$;

— Número y fases de maduración de los folículos contenidos en los ovarios de las hembras P y $F_1$, en su caso;

— Recuento de cuerpos lúteos en los ovarios de las hembras $F_1$;

— Tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

*Parámetros de la cohorte 2:*

— Descripción detallada de los procedimientos utilizados para normalizar las observaciones y los procedimientos, así como las definiciones operativas para asignar puntuación a las observaciones;

— Lista de todos los procedimientos de ensayo utilizados y justificación de su empleo;

— Datos de los procedimientos utilizados para los estudios conductuales/funcionales, neuropatológicos y morfométricos, con información y detalles sobre los dispositivos automáticos;

— Procedimientos para calibrar y garantizar la equivalencia de los dispositivos y el reparto equilibrado de los grupos de tratamiento en los procedimientos de ensayo;

— Breve justificación de las decisiones que impliquen un juicio profesional;

— Descripción detallada de todas las observaciones conductuales/funcionales, neuropatológicas y morfométricas por sexo y grupo de dosis, incluidos tanto los aumentos como los descensos respecto a los controles;

— Peso del encéfalo;

— Eventuales diagnósticos derivados de lesiones y signos neurológicos, incluidas las enfermedades o procesos naturales;

— Imágenes de observaciones modelo;

— Imágenes de baja resolución para evaluar la homología de las secciones empleadas en relación con la morfometría;

▼M5

— Tratamiento estadístico de los resultados, incluidos los modelos estadísticos utilizados para analizar los datos, y los resultados, con independencia de que sean significativos o no;

— Relación de otros eventuales efectos tóxicos con la conclusión acerca del potencial neurotóxico de la sustancia problema, por sexo y grupo de dosis;

— Impacto de cualquier información toxicocinética sobre las conclusiones;

— Datos que apoyan la fiabilidad y sensibilidad del método de ensayo (es decir, datos de resultados positivos y de controles históricos);

— Eventual relación entre efectos neuropatológicos y funcionales;

— NOAEL o dosis de referencia para las madres y los descendientes, por sexo y grupo de dosis;

— Discusión de la interpretación global de los datos sobre la base de los resultados, incluidas la conclusión de si la sustancia problema ha provocado neurotoxicidad para el desarrollo y el NOAEL.

*Parámetros de la cohorte 3:*

— Títulos de anticuerpos de tipo IgM en el suero (sensibilización a SRBC o a KLH) o unidades de PFC en el bazo en respuesta a la IgM (sensibilización a SRBC);

— El comportamiento del ensayo de respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T (TDAR) debe confirmarse como parte del proceso de optimización por el laboratorio que establezca el ensayo por primera vez, y periódicamente (por ejemplo, una vez al año) por todos los laboratorios;

— Discusión de la interpretación global de los datos sobre la base de los resultados, incluidas la conclusión de si la sustancia problema ha provocado inmunotoxicidad para el desarrollo y el NOAEL.

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones, incluidos los valores del NOAEL para efectos sobre los padres y sobre la progenie*

También debe incluirse la eventual información no obtenida durante el estudio, pero que sea útil para la interpretación de los resultados (por ejemplo, semejanzas con los efectos de agentes neurotóxicos conocidos).

**Interpretación de los resultados**

80. Un estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación proporciona información sobre los efectos de la exposición continuada a una sustancia durante todas las fases del ciclo reproductivo, según sea necesario. En particular, el estudio proporciona información sobre el aparato reproductor, y sobre el desarrollo, el crecimiento, la supervivencia y los parámetros funcionales de las crías hasta el DPN 90.

81. La interpretación de los resultados del estudio debe tener en cuenta toda la información disponible sobre la sustancia, incluidas las propiedades fisicoquímicas, toxicocinéticas y toxicodinámicas, la información disponible pertinente sobre análogos estructurales, y los resultados de estudios de toxicidad realizados previamente con la sustancia problema (por ejemplo, toxicidad aguda, toxicidad tras administración continuada, estudios del mecanismo y estudios para evaluar si se producen diferencias cualitativas y cuantitativas importantes en las propiedades metabólicas *in vivo* o *in vitro* de una especie a otra). Si es posible, los resultados de la autopsia macroscópica y del pesaje de los órganos deben interpretarse a la luz de las observaciones realizadas en otros estudios con administración continuada. La disminución del crecimiento de los descendientes podría considerarse en relación con la influencia de la sustancia problema sobre la composición de la leche (29).

▼M5

*Cohorte 2 (neurotoxicidad para el desarrollo)*

82. Los resultados de los estudios neuroconductuales y neuropatológicos deben interpretarse en el contexto de todas las observaciones realizadas, utilizando un planteamiento basado en la ponderación de las pruebas con el juicio de los expertos. Deben ser objeto de discusión las pautas de las eventuales observaciones conductuales o morfológicas, así como las pruebas de una relación dosis-respuesta. Debe incluirse en esta caracterización la evaluación de la neurotoxicidad para el desarrollo, incluidos los estudios epidemiológicos o los informes de casos humanos, y los estudios con animales de experimentación (por ejemplo, datos de toxicocinética, información sobre la relación estructura-actividad, datos de otros estudios de toxicidad). La evaluación de los datos debe incluir una discusión de la significación tanto biológica como estadística. La evaluación debe incluir la eventual relación que pueda existir entre las alteraciones neuropatológicas y conductuales observadas. Para obtener orientaciones sobre la interpretación de los resultados de neurotoxicidad para el desarrollo, véanse el método de ensayo B.53 (35) y Tyl *et al.*, 2008 (31).

*Cohorte 3 (inmunotoxicidad para el desarrollo)*

83. La supresión o el refuerzo de la función inmunológica según lo evaluado mediante el ensayo TDAR (respuesta de anticuerpos dependiente de linfocitos T) debe valorarse en el contexto de todas las observaciones realizadas. La significación del resultado del ensayo TDAR puede reforzarse con el apoyo de otros efectos sobre indicadores relacionados con factores inmunológicos (por ejemplo, estudio de las células de la médula ósea, el pesaje y el examen histopatológico de los tejidos linfáticos, la distribución de las subpoblaciones de linfocitos). Los efectos establecidos mediante el ensayo TDAR pueden ser menos significativos en caso de que se observen otros efectos tóxicos a menores concentraciones de exposición.

84. Debe consultarse el documento de orientación de la OCDE 43 para obtener ayuda en la interpretación de los resultados de neurotoxicidad y toxicidad para la reproducción (26).

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, SL Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology,* 36, 69-98.

(2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.

(3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research, ILSI Press, Washington, DC.

(4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Preweaning Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', International Journal of Toxicology, 24, 87-94.

(5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences,* 49, 1-4.

(6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists,* 14, 293-327.

(7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology,* 37, 356-369.

▼**M5**

(8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats-overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences,* 25, 1-21.

(9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research,* Part B, 68, 408-415.

(10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research,* Part B, 80 (2), 84-97.

(11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization,* Cambridge, New York.

(12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology,* 13: 383-390.

(13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction,* 17, 298-303.

(14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods,* 41, 9-19.

(15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology,* 197, 23-35.

(16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology,* 12, 92-108.

(17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility,* 54, 103-107.

(18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology,* 5, 39-44.

(19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg., L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, SL Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology,* 10, 237- 244.

(20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology,* 6, 267-273.

(21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology,* 13, 409-421.

(22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology,* 5, 449-458.

▼**M5**

(23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A,* Academic, Orlando, Florida. pp. 319-333.

(24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology,* 10, 401-415.

(25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology,* 6, 491-505.

(26) OCDE (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment,* Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OCDE, París.

(27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology,* 8, 330-337.

(28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A "Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology,* 34, 296-313.

(29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology,* 44, 8-16.

(30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Caviness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives,* 115(12), 1717-1726.

(31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology,* 30: 349-381.

(32) OCDE (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test,* OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, París.

(33) Capítulo B.43 del presente anexo, Estudio de neurotoxicidad en roedores.

(34) OCDE (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations,* Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, París.

(35) Capítulo B.53 del presente anexo, Estudio de neurotoxicidad para el desarrollo

(36) Capítulo B.54 del presente anexo, Bioensayo uterotrófico con roedores: ensayo de cribado a corto plazo de las propiedades estrogénicas.

(37) Capítulo B.55 del presente anexo, Bioensayo de Hershberger con ratas: ensayo de cribado a corto plazo de las propiedades (anti)androgénicas.

▼**M5**

(38) OCDE (2009), Guidance Document for Histologic Evalution of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OCDE, París.

(39) OCDE (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OCDE, París.

(40) OCDE (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OCDE, París.

▼M5

*Apéndice 1*

**Medidas y observaciones recogidas en la batería de observaciones funcionales (cohorte 2A)**

| En la jaula de alojamiento y en campo abierto | Con la manipulación | Fisiológicas |
|---|---|---|
| Postura | Facilidad para sacar al animal | Temperatura |
| Movimientos clónicos y tónicos involuntarios | Facilidad de manipulación | Peso corporal |
| Cierre palpebral | Tono muscular | Reflejo pupilar |
| Piloerección | Respuesta a la aproximación | Tamaño de la pupila |
| Salivación | Respuesta al contacto | |
| Lagrimeo | Respuesta auditiva | |
| Vocalizaciones | Respuesta al pellizco de la cola | |
| Encabritamiento | Reflejo de enderezamiento | |
| Anomalías de la marcha | Ensanchamiento del pie al tomar contacto con el suelo | |
| Nivel de alerta | Fuerza de prensión de las patas delanteras | |
| Estereotipias | Fuerza de prensión de las patas traseras | |
| Comportamientos anómalos | | |
| Manchas | | |
| Anomalías respiratorias | | |

▼**M5**

*Apéndice 2*

Definiciones

**Sustancia:** Sustancia o mezcla.

**Sustancia problema:** Toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M5

## B.57. ENSAYO DE ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS H295R

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 456 (2011). La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos de cribado y finales de posibles alteradores endocrinos. El 'OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals' (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos) de 2002 comprende cinco niveles, cada uno de los cuales corresponde a un nivel diferente de complejidad biológica (1). El ensayo de esteroidogénesis en células H295R *in vitro* (ensayo H295R) descrito en el presente método de ensayo utiliza una línea celular de adrenocarcinoma humano (células NCI-H295R) y constituye un ensayo *in vitro* de nivel 2 que aporta datos sobre el mecanismo y que puede utilizarse con fines de cribado y de asignación de prioridades. La elaboración y la normalización del ensayo para el cribado de efectos de las sustancias sobre la esteroidogénesis, específicamente la producción de 17β-estradiol (E2) y de testosterona (T), se llevaron a cabo en un proceso multifásico. El ensayo H295R está optimizado y validado (2)(3)(4)(5).

2. El objetivo del ensayo de esteroidogénesis H295R es detectar sustancias que afecten a la producción de E2 y de T. El ensayo H295R se propone identificar sustancias xenobióticas cuyo sitio diana sean los componentes endógenos que constituyen la ruta bioquímica intracelular iniciada con la secuencia de reacciones a partir del colesterol para producir E2 o T. El ensayo H295R no tiene por objeto identificar sustancias que afecten a la esteroidogénesis actuando sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG). Su finalidad es proporcionar una respuesta de tipo SÍ/NO en lo que se refiere a la posibilidad de que una sustancia induzca o inhiba la producción de T y E2; sin embargo, es posible obtener resultados cuantitativos en algunos casos (véanse los puntos 53 y 54). Los resultados del ensayo se expresan como cambios relativos en la producción hormonal, respecto a los controles de disolvente. El ensayo no pretende ofrecer información sobre el mecanismo específico relativo a la interacción de la sustancia problema con el sistema endocrino. Se han realizado investigaciones con la línea celular para identificar los efectos sobre ciertas enzimas y hormonas intermedias, tales como la progesterona (2).

3. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice. En los apéndices I-III del documento de la OCDE 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' se incluye un protocolo detallado con instrucciones sobre cómo preparar las soluciones, cultivar las células y realizar diversos aspectos del ensayo (4).

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. Hay cinco enzimas diferentes que catalizan seis reacciones diferentes de la biosíntesis de hormonas esteroideas sexuales. La conversión enzimática de colesterol en pregnenolona por la enzima CYP11A, que es del grupo del citocromo P450 (CYP) y que separa la cadena lateral del colesterol, constituye la etapa inicial de una serie de reacciones bioquímicas que culmina en la síntesis de los productos finales esteroideos. En función del orden de las dos reacciones siguientes, el proceso de esteroidogénesis se divide en dos caminos, la vía de los $\Delta^5$-hidroxiesteroides y la vía de los $\Delta^4$-cetoesteroides, que convergen en la producción de androstenodiona (figura 1).

5. La androstenodiona se convierte en testosterona (T) por la acción de la 17β-hidroxiesteroide-deshidrogenasa (17β-HSD). La testosterona es tanto un producto intermedio como una hormona final. En los machos, la T puede convertirse en dihidrotestosterona (DHT) por la 5α-reductasa, que se encuentra en las membranas celulares, la membrana nuclear y el retículo endoplásmico de los tejidos diana de la acción androgénica, como la próstata y las vesículas seminales. La DHT es significativamente más potente como andrógeno que la T y también se considera una hormona final. El ensayo H295R no mide la DHT (véase el punto 10).

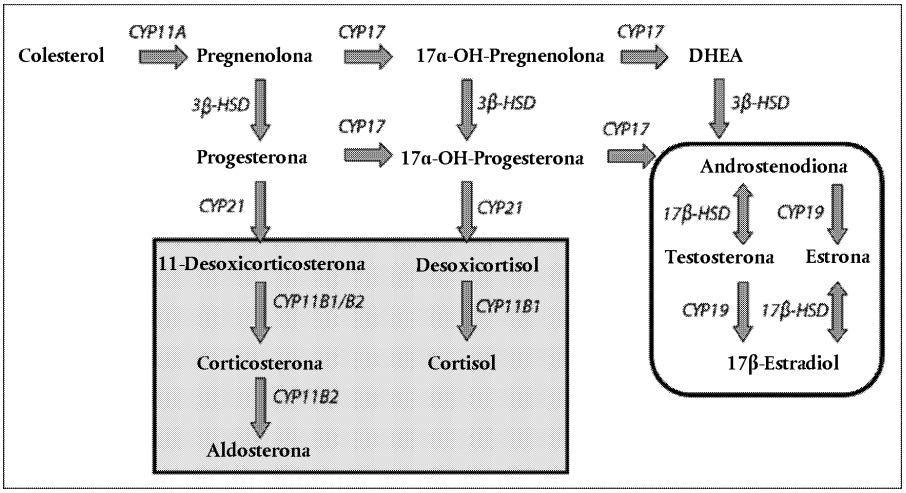
▼M5

6. La enzima de la vía esteroidogénica que convierte las sustancias androgénicas en sustancias estrogénicas es la aromatasa (CYP19). Esta transforma la T en 17β-estradiol (E2) y la androstenodiona en estrona. Tanto el E2 como la T se consideran hormonas finales de la vía esteroidogénica.

7. La especificidad de la actividad liásica de la CYP17 difiere en cuanto a los sustratos intermedios en las distintas especies. En la especie humana, la enzima favorece los sustratos de la vía de los $\Delta^5$-hidroxiesteroides (pregnenolona), mientras que en la rata se ven favorecidos los sustratos de la vía de los $\Delta^4$-cetoesteroides (progesterona) (19). Tales diferencias en la actividad liásica de la CYP17 pueden explicar algunas diferencias según las especies en cuanto a la respuesta a sustancias que alteran la esteroidogénesis *in vivo* (6). Se ha comprobado que las células H295 reflejan muy bien la expresión enzimática suprarrenal y el patrón de producción de esteroides de los adultos de nuestra especie (20), pero se sabe que expresan enzimas tanto de la vía de los $\Delta^5$-hidroxiesteroides como de la de los $\Delta^4$-cetoesteroides para la síntesis de andrógenos (7)(11)(13)(15).

*Figura 1*

**Vía esteroidogénica de las células H295R**




*Nota:*

Las enzimas están en cursiva, las hormonas, en negrita, y las flechas indican la dirección de la síntesis. El fondo gris indica vías/productos de la categoría de los corticoesteroides. Las vías/productos de la categoría de los esteroides sexuales están en el círculo. CYP = citocromo P450; HSD = hidroxiesteroide-deshidrogenasa; DHEA = deshidroepiandroesterona.

8. La línea celular de adrenocarcinoma H295R humano es útil como modelo *in vitro* para la investigación de efectos sobre la síntesis de hormonas esteroideas (2)(7)(8)(9)(10). La línea celular H295R expresa los genes que codifican todas las enzimas clave para la esteroidogénesis indicadas más arriba (11)(15) (figura 1). Se trata de una característica única porque la expresión *in vivo* de estos genes es específica de ciertos tejidos y de ciertas fases del desarrollo, y lo normal es que no haya un solo tejido o una sola fase del desarrollo que exprese todos los genes que participan en la esteroidogénesis (2). Las células H295R tienen características fisiológicas de las células suprarrenales sin diferenciación zonal de los fetos humanos (11). Las células representan un sistema *in vitro* único, ya que tienen la capacidad de producir todas las hormonas esteroideas que se encuentran en la corteza suprarrenal y en las gónadas de los adultos, lo que permite realizar ensayos sobre los efectos en la síntesis de corticoesteroides y en la producción de

▼M5

hormonas esteroideas sexuales, como los andrógenos y los estrógenos, aunque el ensayo está validado solo para detectar T y E2. Los cambios detectados por el sistema de ensayo en forma de alteración de la producción de T y E2 pueden ser resultado de una multitud de distintas interacciones de las sustancias problema con las funciones de la esteroidogénesis que se expresan en las células H295R. Entre estas se incluyen la modulación de la expresión, de la síntesis o de la función de las enzimas que participan en la producción, transformación o eliminación de las hormonas esteroideas (12)(13)(14). La inhibición de la producción hormonal puede deberse a una unión competitiva directa a una enzima de la vía, al impacto sobre cofactores tales como el NADPH (fosfato de nicotinamida-adenin-dinucleótido) y el cAMP (monofosfato de adenosina cíclico), o al incremento del metabolismo de los esteroides o a la supresión de la expresión génica de algunas enzimas de la vía de la esteroidogénesis. Aunque la inhibición puede ser función de procesos tanto directos como indirectos relacionados con la producción de hormonas, la inducción tiene normalmente un carácter indirecto; puede deberse, por ejemplo, a la alteración de cofactores como el NADPH y el cAMP (como en el caso de la forskolina), a la reducción del metabolismo de los esteroides (13) o a la activación de la expresión génica de la esteroidogénesis.

9. El ensayo H295R ofrece varias ventajas:

— Permite la detección tanto de incrementos como de disminuciones de la producción de T y de E2.

— Permite la evaluación directa del efecto potencial de una sustancia sobre la viabilidad celular y la citotoxicidad. Esta es una característica importante, ya que permite discriminar entre los efectos debidos a la citotoxicidad y los debidos a la interacción directa de las sustancias con las vías esteroidogénicas, lo cual no es posible en sistemas de tejidos explantados que están compuestos por múltiples tipos de células con sensibilidades y funcionalidades diferentes;

— No exige la utilización de animales;

— La línea celular H295R está disponible en el comercio.

10. Las limitaciones principales del ensayo son las siguientes:

— Su capacidad metabólica es desconocida, pero probablemente es bastante limitada; por lo tanto, es probable que las sustancias que tienen que activarse metabólicamente pueden pasarse por alto en este ensayo.

— Dado que proceden del tejido suprarrenal, las células H295R poseen las enzimas capaces de producir gluco y mineralocorticoides, así como hormonas sexuales; por tanto, los efectos sobre la producción de gluco y mineralocorticoides pueden influir en los niveles de T y E2 observados en este ensayo.

— Aquí no se mide la DHT, por lo que no se espera que se detecten las sustancias que inhiben la 5α-reductasa, en cuyo caso puede utilizarse el ensayo de Hershberger (16).

— El ensayo H295R no detecta las sustancias que interfieren con la esteroidogénesis por afectar al eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG), ya que esto solo puede estudiarse en animales intactos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. El objetivo del ensayo es la detección de las sustancias que afectan a la producción de T y de E2. La T es también un producto intermedio de la vía que lleva al E2. El ensayo puede detectar sustancias que característicamente inhiben o inducen enzimas de la vía de la esteroidogénesis.

▼M5

12. El ensayo suele efectuarse en condiciones normales de cultivo celular, en placas de cultivo de 24 pocillos. También pueden utilizarse placas de otros tamaños para realizar el ensayo; sin embargo, la siembra y las condiciones experimentales deben adaptarse en consecuencia para mantener el cumplimiento de los criterios de comportamiento.

13. Tras un período de aclimatación de 24 h en placas con múltiples pocillos, se exponen las células durante 48 h a siete concentraciones de la sustancia problema, al menos por triplicado. Como controles, negativo y positivos, se aplican el disolvente y un inhibidor y un inductor de la producción de hormonas conocidos, a una concentración fijada. Al final del período de exposición, se retira el medio de cada pocillo. Se analiza la viabilidad celular en cada pocillo inmediatamente después de retirar el medio. Las concentraciones de las hormonas en el medio pueden medirse utilizando una serie de métodos, incluidos equipos disponibles en el comercio para la medición de hormonas, o técnicas instrumentales como la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS). Los datos se expresan como el factor multiplicador del cambio respecto al control del disolvente y como la concentración con efecto mínimo observado (LOEC). Si el ensayo es negativo, la mayor concentración utilizada en el ensayo se recoge como la concentración sin efecto observado (NOEC). Las conclusiones sobre la capacidad de una sustancia para afectar a la esteroidogénesis deben basarse, como mínimo, en dos tandas de ensayos independientes. La primera tanda de ensayos puede servir para determinar la gama de concentraciones, que se ajustan posteriormente para las tandas 2 y 3, en su caso, si se detectan problemas de solubilidad o de citotoxicidad, o si la actividad de la sustancia parece estar al final de la gama de concentraciones empleada en el ensayo.

PROCEDIMIENTO DE CULTIVO

**Línea celular**

14. Las células NCI-H295R se pueden conseguir comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC) previa firma de un acuerdo de transferencia de material (ATM) ([1]).

**Introducción**

15. Debido a los cambios en la capacidad de producción de E2 de las células al aumentar la edad o el número de pases (2), es necesario que las células se cultiven según un protocolo específico, antes de utilizarse, y hay que anotar el número de pases desde la descongelación de las células, así como el número de pases al que las células se han congelado y colocado en nitrógeno líquido para su almacenamiento. El primer número indica el número real de pases celulares y el segundo número es el de pases al que las células se han congelado y almacenado. Por ejemplo, unas células congeladas después del pase 5, y que luego se han descongelado y resembrado tres veces (4 pases contando las células recién descongeladas como pase 1) después de haberse cultivado de nuevo se etiquetarían como pase 4.5. En el apéndice I del informe de validación se ilustra un ejemplo del sistema de numeración (4).

16. Se utiliza un medio de partida como base para los medios suplementado y de congelación. El medio suplementado es un componente necesario para el cultivo de las células. El medio de congelación está concebido específicamente para permitir la congelación de las células para su almacenamiento a largo plazo sin problemas. Antes de su utilización, debe analizarse el suero Nu-serum (o un suero comparable de propiedades similares del que se haya demostrado que sirve para producir datos que cumplen los requisitos de control de calidad y de comportamiento del ensayo), que es un componente de los medios suplementados, en cuanto a sus concentraciones de base de T y de E2. En el apéndice II del informe de validación se describe la preparación de estas soluciones (4).

([1]) ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA, [http://www.lgcstandards-atcc.org/].

▼M5

17. Tras el inicio de un cultivo de células H295R a partir de un lote original de la ATCC, hay que cultivar las células a lo largo de cinco pases (es decir, hay que resembrarlas 4 veces). Las células del pase 5 se congelan en nitrógeno líquido para su almacenamiento. Antes de congelar las células, se cultiva una muestra de células del pase 4 anterior en una placa de control de calidad (véanse los puntos 36 y 37) para verificar si la producción basal de hormonas y la respuesta a las sustancias de control positivo cumplen los criterios de control de calidad del ensayo, definidos en el cuadro 5.

18. Las células H295R deben cultivarse, congelarse y almacenarse en nitrógeno líquido para asegurarse de que siempre hay células del paso/edad apropiado disponibles para su cultivo y utilización. El número máximo de pases tras poner en cultivo un lote nuevo ([1]) o congelado ([2]) de células aceptable para su uso en el ensayo H295R no debe superar los 10. Por ejemplo, los pases aceptables para los cultivos de células de un lote congelado en el pase 5 van de 4.5 a 10.5. Con las células cultivadas a partir de estos lotes congelados, debe seguirse el procedimiento contemplado en el punto 19. Estas células deben cultivarse durante al menos cuatro (4) pases adicionales (pase 4.5) antes de utilizarse en el ensayo.

**Cultivo de células a partir de material congelado**

19. El procedimiento para cultivar células a partir de material congelado debe utilizarse en los casos en que se toma un lote nuevo de células de su almacenamiento en nitrógeno líquido para su cultivo y utilización en el ensayo. Los detalles de este procedimiento son los indicados en el apéndice III del informe de validación (4). Las células se retiran de su almacenamiento en nitrógeno líquido, se descongelan rápidamente, se colocan en medio suplementado en un tubo de centrífuga, se centrifugan a temperatura ambiente, se vuelven a suspender en medio suplementado, y se transfieren a un matraz de cultivo. El medio debe cambiarse el día siguiente. Las células H295R se cultivan en estufa a 37 °C en atmósfera de aire con un 5 % de $CO_2$, y el medio se renueva 2-3 veces por semana. Cuando las células presentan una confluencia del 85-90 % aproximadamente, deben resembrarse. La resiembra de las células es necesaria para garantizar su salud y crecimiento y para mantenerlas con vistas a la realización de bioensayos. Las células se lavan tres veces con solución salina amortiguadora de fosfato (PBS, sin $Ca^{2+}$ ni $Mg^{2+}$ y se liberan del matraz de cultivo mediante la adición de una enzima adecuada de separación como, por ejemplo, la tripsina, en PBS (sin $Ca^{2+}$ ni $Mg^{2+}$). Inmediatamente después de que las células se hayan desprendido del matraz de cultivo, debe detenerse la acción de la enzima con la adición de medio suplementado en la proporción de tres veces el volumen que se ha utilizado para el tratamiento enzimático. Las células se ponen en un tubo de centrífuga y se centrifugan a temperatura ambiente, el sobrenadante se elimina y el precipitado de células se vuelve a suspender en medio suplementado. Se coloca en el nuevo matraz de cultivo la cantidad apropiada de suspensión de células. La cantidad de suspensión de células debe ajustarse de forma que las células se hagan confluentes en el plazo de 5 a 7 días. La proporción recomendada de subcultivo es de 1:3 a 1:4. La placa debe etiquetarse cuidadosamente. Las células están entonces dispuestas para utilizarse en el ensayo y las células excedentarias deben congelarse en nitrógeno líquido como se describe en el punto 20.

([1]) Por «lote nuevo» se entiende un lote de células recién recibido de la ATCC.

([2]) Por «lote congelado» se entiende el de células que se han cultivado y congelado previamente en un laboratorio distinto de la ATCC.

▼M5

**Congelación de las células H295R (preparación para su almacenamiento en nitrógeno líquido)**

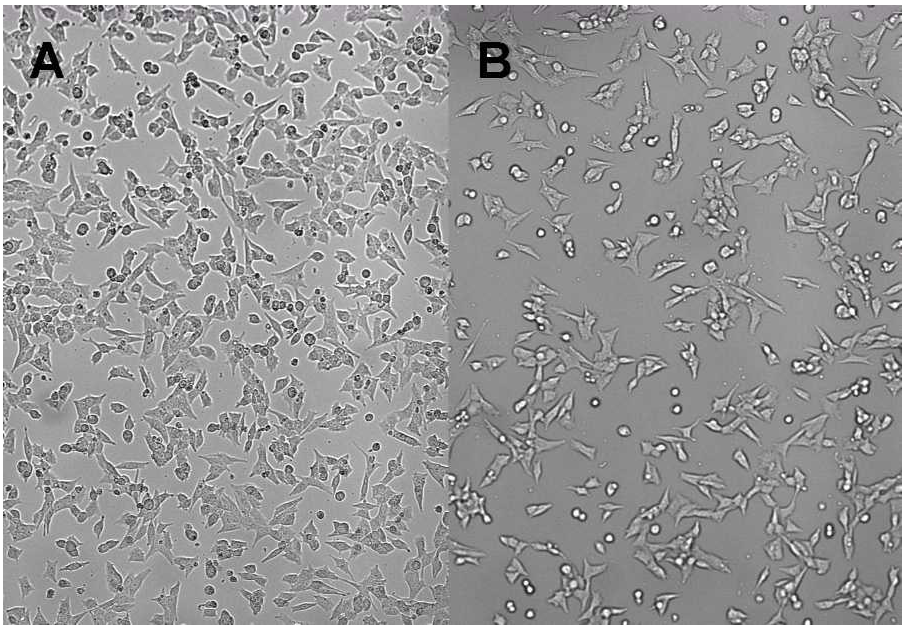
20. A fin de preparar las células H295R para su congelación, el procedimiento descrito anteriormente para resembrar las células debe seguirse hasta la etapa de nueva suspensión del precipitado de células del fondo del tubo de centrífuga. En este caso, el precipitado de células se vuelve a suspender en medio de congelación. La suspensión se transfiere a un tubo criogénico, etiquetado de forma apropiada, y se congela a – 80 °C durante 24 horas, tras lo cual el tubo criogénico se transfiere a nitrógeno líquido para su almacenamiento. Los detalles de este procedimiento son los indicados en el apéndice III del informe de validación (4).

**Siembra en placas y preincubación de las células para el ensayo**

21. El número necesario de placas de 24 pocillos, preparadas como se indica en el punto 19, dependerá del número de sustancias que se hayan de someter al ensayo y de la confluencia de las células en los matraces de cultivo. Como norma general, un solo matraz de cultivo (75 $cm^2$) de células con una confluencia del 80-90 % proporciona bastantes células para poblar de 1 a 1,5 placas (de 24 pocillos) con una densidad objetivo de 200 000 a 300 000 células por ml de medio, que resulta en una confluencia aproximada del 50-60 % en los pocillos al cabo de 24 horas (figura 2). Esta es normalmente la densidad celular óptima para la producción de hormonas en el ensayo. Con densidades superiores, se altera el patrón de producción de T y de E2. Antes de realizar el ensayo por primera vez, se recomienda probar diferentes densidades de inóculo, entre 200 000 y 300 000 células por ml, y seleccionar para el resto de los experimentos la densidad que procure una confluencia del 50-60 % en el pocillo al cabo de 24 horas.

*Figura 2*

**Microfotografías de células H295R con una densidad de inóculo del 50 % en una placa de cultivo de 24 pocillos a las 24 horas, tomadas en el borde (A) y en el centro (B) de un pocillo**




22. Con pipeta, se retira el medio del matraz de cultivo, y las células se lavan 3 veces con PBS estéril (sin $Ca^{2+}$ ni $Mg^{2+}$). Se añade una solución enzimática (en PBS) para desprender las células del matraz de cultivo. Tras un tiempo adecuado para que las células se desprendan, debe detenerse la acción de la enzima con la adición de medio suplementado en la proporción de tres veces el volumen que se ha utilizado para el tratamiento enzimático. Las células se ponen en un tubo de centrífuga, se centrifugan a temperatura

▼M5

ambiente, el sobrenadante se elimina y el precipitado de células se vuelve a suspender en medio suplementado. La densidad celular se calcula utilizando, por ejemplo, un hemocitómetro o un contador celular. La suspensión celular debe diluirse hasta obtener la deseada densidad de siembra en placa y mezclarse bien para conseguir una densidad celular homogénea. Las células deben ponerse en las placas a razón de 1 ml de la suspensión celular por pocillo, y las placas y pocillos deben etiquetarse. Las placas sembradas se incuban a 37 °C en atmósfera de aire con 5 % de $CO_2$ durante 24 horas para que las células puedan adherirse a los pocillos.

REQUISITOS DE CONTROL DE CALIDAD

23. Es fundamental que se pongan en los pocillos los volúmenes exactos de las soluciones y muestras al realizar el ensayo, ya que estos volúmenes determinan las concentraciones utilizadas para calcular los resultados del ensayo.

24. Antes de iniciar el cultivo celular y cualesquiera otras pruebas posteriores, cada laboratorio debe demostrar la sensibilidad de su sistema de medición de hormonas (puntos 29-31).

25. Si se van a aplicar sistemas de medición de hormonas que utilizan anticuerpos, debe analizarse antes de iniciar el ensayo el potencial de las sustancias problema para interferir con el sistema de medición aplicado para cuantificar la T y el E2 como se indica en el punto 32.

26. El DMSO es el disolvente recomendado para este ensayo. Si se utiliza otro disolvente, debe determinarse lo siguiente:

— la solubilidad de la sustancia problema, de la forskolina y del procloraz en el disolvente, así como

— la citotoxicidad en función de la concentración de disolvente.

Se recomienda que la concentración máxima permisible de disolvente no supere una dilución de 10 veces la menor concentración citotóxica del disolvente.

27. Antes de llevar a cabo el ensayo por primera vez, el laboratorio debe realizar un experimento de evaluación de la aptitud, en el que se demuestre que el laboratorio es capaz de mantener y lograr unos cultivos celulares adecuados y las condiciones experimentales necesarias para los ensayos de sustancias, como se describe en los puntos 33-35.

28. Cuando se inicie un ensayo con un lote nuevo de células, debe aplicarse el procedimiento a una placa de control antes de utilizar el lote nuevo, a fin de evaluar el comportamiento de las células, como se describe en los puntos 36 y 37.

**Comportamiento del sistema de medición de hormonas**

*Sensibilidad, exactitud, precisión y reactividad cruzada con la matriz de muestra*

29. Cada laboratorio puede utilizar el sistema de medición de hormonas que prefiera para el análisis de la producción de T y de E2 por las células H295R siempre que cumpla los criterios de comportamiento, incluido el límite de cuantificación (LC). Los valores de este límite son, en principio, 100 pg/ml para T y 10 pg/ml para E2, establecidos según los niveles hormonales basales observados en los estudios de validación. No obstante, puede ser apropiado aplicar niveles superiores o inferiores en función de los niveles hormonales basales obtenidos en el laboratorio que realice el ensayo. Antes de iniciar la placa de control de calidad y las tandas de ensayo, el laboratorio debe demostrar que el sistema hormonal que se va a utilizar

▼M5

puede medir las concentraciones hormonales en el medio suplementado, con la suficiente exactitud y precisión para cumplir los criterios de control de calidad especificados en los cuadros 1 y 5, mediante el análisis del medio suplementado al que se ha añadido un control interno de hormona. Al medio suplementado se le deben añadir al menos tres concentraciones de cada hormona (por ejemplo, 100, 500 y 2 500 pg/ml de T; 10, 50 y 250 pg/ml de E2; o también, como concentraciones añadidas más bajas de T y de E2, pueden usarse las concentraciones más bajas posibles según los límites de detección del sistema de medición hormonal elegido), y a continuación se analiza. Las concentraciones hormonales medidas en muestras no extraídas no deben alejarse más del 30 % de las concentraciones nominales, y la variación entre mediciones replicadas de la misma muestra no debe superar el 25 % (véanse también en el cuadro 8 criterios adicionales de control de calidad). Si se cumplen estos criterios de control de calidad, se supone que el sistema seleccionado de medición hormonal es suficientemente exacto, preciso y no presenta reactividad cruzada con los componentes del medio (matriz de la muestra) de modo que pudiera preverse una influencia significativa sobre el resultado del ensayo. En tal caso, no es necesario proceder a ninguna extracción de las muestras antes de realizar las mediciones hormonales.

30. En caso de que no se cumplan los criterios de control de calidad de los cuadros 1 y 8, puede estar dándose un efecto matricial significativo, y debe llevarse a cabo un experimento con medio al que se ha añadido la hormona y luego se ha sometido a extracción. En el apéndice II del informe de validación se describe un ejemplo de procedimiento de extracción (4). Las mediciones de las concentraciones hormonales en las muestras extraídas deben hacerse por triplicado ([1]). Si se puede demostrar que, previa extracción, los componentes del medio no interfieren con el método de detección de las hormonas según lo definido por los criterios de control de calidad, todos los experimentos posteriores deben realizarse utilizando muestras extraídas. Si los criterios de control de calidad no pueden cumplirse ni siquiera después de efectuar la extracción, es que el sistema de medición hormonal utilizado no es adecuado para los fines del ensayo de esteroidogénesis H295R, y hay que emplear un método alternativo de detección hormonal.

*Curva patrón*

31. Las concentraciones hormonales de los controles de disolvente (CD) deben situarse en la porción lineal de la curva patrón. Es preferible que los valores de CD queden cerca del centro de la porción lineal para garantizar que puedan medirse la inducción y la inhibición de la síntesis de las hormonas. Las diluciones del medio (o extractos) que hayan de medirse deben seleccionarse en consecuencia. La relación lineal debe determinarse mediante un método estadístico adecuado.

*Prueba de interferencia de las sustancias*

32. Si para medir las hormonas van a utilizarse sistemas con intervención de anticuerpos, tales como los ensayos de inmunoadsorción enzimática (ELISA) y los radioinmunoanálisis (RIA), debe probarse cada sustancia en cuanto a su posible interferencia con el sistema de medición hormonal que vaya a emplearse, antes del inicio de los ensayos propiamente dichos de la sustancia [apéndice III del informe de validación (4)], ya que algunas sustancias pueden interferir con estos sistemas (17). Si se produce una interferencia, esto es, un aumento ≥ 20 % de la producción basal de hormonas T y/o E2, según lo determinado por el análisis hormonal, debe llevarse a cabo la prueba de interferencia del sistema de medición hormonal con la sustancia [tal como se describe en la sección 5.0 del apéndice III del informe de validación (4)] con todas las diluciones de la solución madre de la sustancia problema, a fin de identificar la dosis umbral a partir de la que se produce una interferencia significativa (≥ 20 %). Si la interferencia es

([1]) *Nota:* Si es necesario realizar la extracción, se efectúan tres mediciones replicadas de cada extracto. Cada muestra se extrae una sola vez.

▼M5

inferior al 30 %, es posible corregir los resultados para tener en cuenta la interferencia. Si la interferencia es superior al 30 %, los datos correspondientes a esas concentraciones son inválidos y hay que descartarlos. En caso de que haya interferencia significativa de una sustancia problema con un sistema de medición hormonal a más de una concentración no citotóxica, debe utilizarse un sistema de medición hormonal diferente. Con el fin de evitar la interferencia de las sustancias contaminantes, se recomienda que se extraigan las hormonas del medio utilizando un disolvente adecuado; pueden encontrarse posibles métodos en el informe de validación (4).

*Cuadro 1*

**Criterios de comportamiento de los sistemas de medición hormonal**

| Parámetro | Criterio |
|---|---|
| Sensibilidad del método de medición | Límite de cuantificación (LC)<br>T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml [a] |
| Eficacia de la extracción hormonal (solo cuando haga falta efectuar la extracción) | Las tasas de recuperación medias (a partir de mediciones triplicadas) de las cantidades añadidas de hormona no deben desviarse en más del 30 % de la cantidad añadida. |
| Interferencia con la sustancia (solo para sistemas que utilizan anticuerpos) | No debe haber reactividad cruzada importante (≥ 30 % de la producción basal de la hormona respectiva) con ninguna de las hormonas producidas por las células [b] [c]. |

[a] *Nota:* Los límites del método de medición se basan en los valores de producción hormonal basal que se recogen en el cuadro 5, y son función del comportamiento. Si se puede conseguir una mayor producción hormonal basal, el límite puede ser mayor.

[b] Algunos anticuerpos contra la T y el E2 pueden presentar reacción cruzada con la androstenodiona y la estrona, respectivamente, en un porcentaje mayor. En tales casos, no es posible determinar exactamente los efectos sobre la 17β-HSD. Sin embargo, los datos pueden seguir proporcionando información útil en relación con los efectos sobre la producción de estrógenos o de andrógenos en general. En estos casos, los datos deben expresarse como respuestas androgénicas/estrogénicas, más que como E2 y T.

[c] Entre estas figuran las siguientes: colesterol, pregnenolona, progesterona, 11-desoxicorticosterona, corticosterona, aldosterona, 17α-pregnenolona, 17α-progesterona, desoxicortisol, cortisol, DHEA, androstenodiona, estrona.

**Prueba de competencia del laboratorio**

33. Antes de ensayar sustancias desconocidas, el laboratorio debe demostrar que tiene capacidad para mantener y lograr unos cultivos celulares adecuados y las condiciones experimentales necesarias para la correcta realización del ensayo, efectuando la prueba de competencia del laboratorio. Dado que el comportamiento de un ensayo está relacionado directamente con el personal del laboratorio que lo lleva a cabo, estos procedimientos deben repetirse parcialmente si se produce algún cambio en el personal del laboratorio.

34. Esta prueba de competencia se efectuará en las mismas condiciones recogidas en los puntos 38 a 40, exponiendo las células a siete concentraciones crecientes de inductores e inhibidores fuertes, moderados y débiles, así como a una sustancia negativa (véase el cuadro 2). En concreto, las sustancias que deben utilizarse son las siguientes: el inductor fuerte forskolina (nº CAS 66575-29-9); el inhibidor fuerte procloraz (nº CAS 67747-09-5); el inductor moderado atrazina (nº CAS 1912-24-9); el inhibidor moderado

▼M5

aminoglutetimida (nº CAS 125-84-8); el inductor débil (producción de E2) e inhibidor débil (producción de T) bisfenol A (nº CAS 80-05-7); y la sustancia negativa gonadotropina coriónica humana (HCG) (nº CAS 9002-61-3), como se indica en el cuadro 2. Se utilizan placas separadas para todas las sustancias siguiendo el formato indicado en el cuadro 6. En cada tanda diaria debe incluirse una placa de control de calidad (cuadro 4, puntos 36-37) para las sustancias de la prueba de competencia.

*Cuadro 2*

**Sustancias de la prueba de competencia y concentraciones de exposición**

| Sustancia de la prueba de competencia | Concentraciones de ensayo [μM] |
|---|---|
| Procloraz | 0 (a), 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 |
| Forskolina | 0 (a), 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 |
| Atrazina | 0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 |
| Aminoglutetimida | 0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 |
| Bisfenol A | 0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 |
| HCG | 0 (a), 0,03, 0,1, 1, 3, 10, 30, 100 |

(a) Control de disolvente (DMSO) (0), 1 μl DMSO/pocillo

Las células H295R deben exponerse a las sustancias de la prueba de competencia en placas de 24 pocillos durante la prueba de competencia del laboratorio. Las unidades de concentración son μM para las dosis de todas las sustancias de la prueba. Las sustancias deben aplicarse disueltas en DMSO al 0,1 % v/v por pocillo. Todas las concentraciones de la prueba deben ensayarse en pocillos por triplicado (cuadro 6). Se utilizan placas separadas para cada sustancia. En cada tanda diaria se incluye una placa de control de calidad.

35. Deben efectuarse el análisis de la viabilidad celular y los análisis hormonales según lo establecido en los puntos 42 a 46. El valor umbral (concentración mínima con efecto observado, LOEC) y la decisión sobre la clasificación deben comunicarse y compararse con los valores del cuadro 3. Los datos se consideran aceptables si cumplen el valor umbral de LOEC y la clase de decisión del cuadro 3.

*Cuadro 3*

**Valores umbrales (LOEC) y clases de decisión para las sustancias de la prueba de competencia**

| | Nº CAS | LOEC [μM] | | Clase de decisión | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | T | E2 | T | E2 |
| Procloraz | 67747-09-5 | ≤ 0,1 | ≤ 1,0 | + (a) (Inhibición) | + (Inhibición) |
| Forskolina | 66575-29-9 | ≤ 10 | ≤ 0,1 | + (Inducción) | + (Inducción) |
| Atrazina | 1912-24-9 | ≤ 100 | ≤ 10 | + (Inducción) | + (Inducción) |
| Aminoglutetimida | 125-84-8 | ≤ 100 | ≤ 100 | + (Inhibición) | + (Inhibición) |

▼M5

| | Nº CAS | LOEC [μM] | | Clase de decisión | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | T | E2 | T | E2 |
| Bisfenol A | 80-05-7 | ≤ 10 | ≤ 10 | + (Inhibición) | + (Inducción) |
| HCG | 9002-61-3 | N. a. | N. a. | Negativa | Negativa |

(a) +, positiva
N a., no aplicable ya que no debe haber cambios tras la exposición a concentraciones no citotóxicas del control negativo.

**Placa de control de calidad**

36. La placa de control de calidad se utiliza para verificar el comportamiento de las células H295R en condiciones normales de cultivo, y para establecer una base de datos históricos de las concentraciones hormonales en los controles de disolvente y en los controles positivos y negativos, así como otras medidas de control de calidad a lo largo del tiempo.

— El comportamiento de las células H295R debe evaluarse utilizando una placa de control de calidad para cada lote nuevo de la ATCC o después de utilizar por primera vez una población congelada de células, salvo que se haya efectuado con ese lote de células la prueba de competencia del laboratorio (puntos 32-34).

— Una placa de control de calidad proporciona una evaluación completa de las condiciones del ensayo (por ejemplo, viabilidad de las células, controles de disolvente, controles negativos y positivos, así como variabilidad intra e inter-ensayos) cuando se estudian las sustancias, y debe formar parte de cada tanda del ensayo.

37. La prueba de control de calidad se efectúa en una placa de 24 pocillos, con los mismos procedimientos de incubación, administración, viabilidad celular/citotoxicidad, extracción hormonal y análisis hormonal que se describen en los puntos 38 a 46 para las sustancias problema. La placa de control de calidad incluye blancos, controles del disolvente y dos concentraciones de un inductor (forskolina, 1, 10 μM) y de un inhibidor (procloraz, 0,1, 1 μM) conocidos de la síntesis de E2 y de T. Además, se utiliza MeOH en determinados pocillos como control positivo del ensayo de viabilidad o de citotoxicidad. En el cuadro 4 se recoge una descripción detallada del diseño de la placa. En el cuadro 5 se indican los criterios que debe cumplir la placa de control de calidad. Tanto los pocillos de control de disolvente como los pocillos en blanco deben respetar el nivel mínimo de producción hormonal basal de T y de E2.

*Cuadro 4*

**Diseño de la placa de control de calidad para comprobar el comportamiento de las células H295R sin exponer y de las células expuestas a un inhibidor (PRO = procloraz) y a un inductor (FOR = forskolina) conocidos de la producción de E2 y de T. Una vez terminado el experimento de exposición y tras haber retirado el medio, se añade una solución de metanol al 70 % a todos los pocillos de MeOH para servir de control positivo de la citotoxicidad [véase el ensayo de citotoxicidad en el apéndice III del informe de validación (4)]**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | Blanco (a) | Blanco (a) | Blanco (a) | Blanco (a) (+ MeOH) (b) | Blanco (a) (+ MeOH) (b) | Blanco (a) (+ MeOH) (b) |
| B | DMSO (c) 1 μl | DMSO (c) 1 μl | DMSO (c) 1 μl | DMSO (c) 1 μl (+ MeOH) (b) | DMSO (c) 1 μl (+ MeOH) (b) | DMSO (c) 1 μl (+ MeOH) (b) |

▼M5

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C | FOR 1 µM | FOR 1 µM | FOR 1 µM | PRO 0,1 µM | PRO 0,1 µM | PRO 0,1 µM |
| D | FOR 10 µM | FOR 10 µM | FOR 10 µM | PRO 1 µM | PRO 1 µM | PRO 1 µM |

([a]) Las células de los pocillos en blanco solo reciben medio (es decir, sin disolvente).
([b]) El metanol (MeOH) se añade **después** de que haya terminado la exposición y se haya retirado el medio de estos pocillos.
([c]) Control del disolvente DMSO (1 µl/pocillo).

*Cuadro 5*

**Criterios de comportamiento de la placa de control de calidad**

| | T | E2 |
|---|---|---|
| Producción hormonal basal en el control del disolvente (CD) | ≥ 5 veces el límite de cuantificación | ≥ 2,5 veces el límite de cuantificación |
| Inducción (10 µM de forskolina) | ≥ 1,5 veces el CD | ≥ 7,5 veces el CD |
| Inhibición (1 µM de procloraz) | ≤ 0,5 veces el CD | ≤ 0,5 veces el CD |

PROCEDIMIENTO DE EXPOSICIÓN A LAS SUSTANCIAS

38. Las células preincubadas se retiran de la estufa (punto 21) y se observan al microscopio para asegurarse de que están en buenas condiciones (fijación, morfología) antes de la administración de la sustancia.

39. Las células se colocan en una campana de bioseguridad y se retira el medio suplementado, que se sustituye por medio suplementado nuevo (1 ml/pocillo). El DMSO es el disolvente preferido para este método de ensayo. Sin embargo, si existen razones para utilizar otros disolventes, deberá describirse la justificación científica. Se exponen las células a la sustancia problema añadiendo 1 µl de la solución adecuada en DMSO [véase el apéndice II del informe de validación (4)] por ml de medio suplementado (volumen del pocillo). Así se consigue una concentración final del 0,1 % de DMSO en los pocillos. Para garantizar una mezcla adecuada, en general es preferible que la solución adecuada de la sustancia problema en DMSO se mezcle con medio suplementado para obtener la concentración final deseada en relación con cada dosis, y la mezcla se añade a cada pocillo inmediatamente después de la retirada del medio viejo. Si se utiliza esta opción, la concentración de DMSO (0,1 %) debe ser la misma en todos los pocillos. Los pocillos con las dos mayores concentraciones se someten a evaluación visual utilizando una lupa binocular para detectar la posible formación de precipitados o turbidez, la cual indicaría que la sustancia de ensayo no se ha disuelto completamente. Si se observan estas condiciones (turbidez, formación de precipitados), se examinarán también los pocillos que contengan las concentraciones inmediatamente inferiores (y así sucesivamente) y se excluirán del análisis y evaluación posteriores las concentraciones a las que la solución no sea completa. La placa se vuelve a poner en la estufa a 37 $^{o}$C en atmósfera de aire con 5 % de $CO_2$ durante 48 horas. En el cuadro 6 se indica el diseño de la placa de la sustancia problema. Las soluciones 1-7 indican la distribución de las dosis de la sustancia problema en orden creciente.

▼M5

*Cuadro 6*

**Esquema de las dosis para la exposición de las células H295R a las sustancias problema en una placa de 24 pocillos**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | DMSO | DMSO | DMSO | Solución 4 | Solución 4 | Solución 4 |
| B | Solución 1 | Solución 1 | Solución 1 | Solución 5 | Solución 5 | Solución 5 |
| C | Solución 2 | Solución 2 | Solución 2 | Solución 6 | Solución 6 | Solución 6 |
| D | Solución 3 | Solución 3 | Solución 3 | Solución 7 | Solución 7 | Solución 7 |

40. Tras 48 horas de exposición, se retiran las placas de la estufa y cada pocillo se observa al microscopio para ver las condiciones de las células (fijación, morfología, grado de confluencia) y los eventuales signos de citotoxicidad. El medio de cada pocillo se divide en dos porciones iguales (de unos 490 µl cada una) que se transfieren a dos tubos distintos, etiquetados de la forma adecuada (una de las alícuotas servirá de muestra de reserva de cada pocillo). Para evitar que las células se desequen, el medio se va retirando al ritmo de una fila o columna a la vez y se va sustituyendo con medio para el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad. Si no se va a medir inmediatamente la viabilidad celular/citotoxicidad, hay que añadir a cada pocillo 200 µl de PBS con $Ca^{2+}$ y $Mg^{2+}$. Los medios se congelan a – 80 °C hasta que se proceda a analizar las concentraciones hormonales (véanse los puntos 44-46). Si bien la T y el E2 en el medio mantenido a – 80 °C son estables en general durante al menos 3 meses, es necesario documentar la estabilidad de las hormonas durante el almacenamiento en cada laboratorio.

41. Inmediatamente después de retirar el medio, se determina la viabilidad celular/citotoxicidad de cada placa de exposición.

**Determinación de la viabilidad celular**

42. Para determinar el impacto potencial de la sustancia problema sobre la viabilidad celular puede utilizarse el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad que se prefiera. El ensayo debe ser capaz de proporcionar una medida real del porcentaje de células viables presentes en un pocillo, o ha de demostrarse que es directamente comparable a una función lineal del ensayo Live/Dead® [véase el apéndice III del informe de validación (4)]. Un ensayo alternativo del que se ha demostrado que funciona igual de bien es el ensayo del MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (18). La evaluación de la viabilidad celular utilizando los métodos anteriormente mencionados es una medición relativa que no tiene necesariamente una relación lineal con el número absoluto de células de un pocillo. Por lo tanto, el analista debe llevar a cabo en paralelo una evaluación visual subjetiva de cada pocillo, y han de tomarse fotos digitales de los controles de disolvente y de las dos mayores concentraciones no citotóxicas, fotos que deben conservarse para permitir la evaluación posterior de la densidad celular real, en caso de que fuera necesario. Si la inspección visual o el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad parecen indicar un aumento del número de células, habrá que verificar dicho aumento aparente. Si se confirma el aumento del número de células, este extremo debe reflejarse en el informe del ensayo. La viabilidad celular se expresará en relación con la respuesta media en los controles de disolvente, que se considera el 100 % de células viables, y se calcula de la forma adecuada según el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad que se haya empleado. Con el ensayo del MTT se podrá utilizar la fórmula siguiente:

▼M5

**% células viables =** (respuesta en el pocillo – respuesta media en los pocillos tratados con MeOH [= mortalidad del 100 %]) ÷ (respuesta media en los pocillos de control del disolvente – respuesta media en los pocillos tratados con MeOH [= mortalidad del 100 %])

43. No deben incluirse en el análisis final de los datos los pocillos con una viabilidad inferior al 80 %, respecto a la viabilidad media de los controles de disolvente (= viabilidad del 100 %). Hay que evaluar cuidadosamente la inhibición de la esteroidogénesis que se dé en presencia de una citotoxicidad de casi el 20 %, para asegurarse de que la citotoxicidad no es la causa de la inhibición.

**Análisis hormonal**

44. Cada laboratorio puede utilizar el sistema de medición hormonal que prefiera para el análisis de la T y del E2. Las alícuotas de medio de reserva de cada grupo de tratamiento pueden utilizarse para preparar diluciones a fin de llevar la concentración a la porción lineal de la curva patrón. Como se indica en el punto 29, cada laboratorio debe demostrar la conformidad de su sistema de medición hormonal (por ejemplo, ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) con los criterios de control de calidad analizando medio suplementado al que se ha añadido un patrón interno de hormona antes de efectuar las tandas de control de calidad o de llevar a cabo el ensayo de las sustancias problema. A fin de garantizar que los componentes del sistema de ensayo no interfieren con la medición de las hormonas, es posible que se tengan que extraer estas de los medios antes de medirlas (véase el punto 30 sobre las condiciones que hacen necesaria la extracción de las hormonas). Se recomienda llevar a cabo la extracción siguiendo los procedimientos del apéndice III del informe de validación (4).

45. Si se utiliza un equipo de ensayo comercial para medir la producción de hormonas, el análisis de estas debe realizarse según lo especificado en los manuales proporcionados por el fabricante del equipo de ensayo. La mayoría de los fabricantes tienen un procedimiento original para efectuar dichos análisis. Las diluciones de las muestras deben ajustarse de manera que las concentraciones hormonales previstas para los controles de disolvente caigan en el centro del intervalo lineal de la curva patrón del ensayo concreto de que se trate [apéndice III del informe de validación (4)]. Deben rechazarse los valores que queden fuera de la porción lineal de la curva patrón.

46. Las concentraciones hormonales finales se calcularán de la manera siguiente:

Ejemplo:

| | |
|---|---|
| Extracción: | 450 µl de medio |
| Reconstitución en: | 250 µl de amortiguador del ensayo |
| Dilución en el ensayo: | 1:10 (para llevar la muestra al intervalo lineal de la curva patrón) |
| Concentración hormonal en el ensayo: | 150 pg/ml (ya ajustada a la concentración por ml de muestra analizada) |
| Recuperación: | 89 % |
| Concentración hormonal final = | (concentración hormonal (por ml) ÷ recuperación) (factor de dilución) |
| Concentración hormonal final = | (150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml |

▼M5

**Selección de las concentraciones de ensayo**

47. Debe llevarse a cabo un mínimo de dos tandas independientes del ensayo. Salvo que se disponga de información anterior, por ejemplo sobre los límites de solubilidad o sobre la citotoxicidad, que permita seleccionar las concentraciones de ensayo, se recomienda que las concentraciones de la sustancia problema en la tanda inicial estén separadas por intervalos logarítmicos, siendo $10^{-3}$ M la concentración máxima. Si la sustancia es soluble, y no es citotóxica a ninguna de las concentraciones ensayadas, y la primera tanda ha sido negativa para todas las concentraciones, hay que confirmar entonces con otra tanda aplicando las mismas condiciones que en la primera (cuadro 7). Si los resultados de la primera tanda son *dudosos* (es decir, si el factor multiplicador del cambio es estadísticamente significativo respecto al control de disolvente solo a una concentración) o positivos (es decir, el factor multiplicador del cambio es estadísticamente significativo a dos o más concentraciones adyacentes), debe repetirse el ensayo tal como se indica en el cuadro 7, afinando las concentraciones de ensayo seleccionadas. Las concentraciones de ensayo de las tandas dos y tres (en su caso) deben ajustarse en función de los resultados de las concentraciones extremas de la tanda inicial que hayan provocado efectos utilizando un intervalo semilogarítmico entre concentraciones (por ejemplo, si con la serie original de 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1 000 μM se han inducido efectos a 1 y 10 μM, las concentraciones usadas en la segunda tanda deberán ser 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 μM), salvo que haya que emplear concentraciones inferiores para conseguir una LOEC. En este último caso, deben utilizarse en la segunda tanda por lo menos cinco concentraciones por debajo de la menor concentración estudiada en la primera tanda, aplicando una escala semilogarítmica. Si esta segunda tanda no confirma los resultados de la primera (es decir, no se encuentra significación estadística a la concentración de ensayo que anteriormente ha dado resultado positivo, con un incremento de concentración de ± 1), se realizará un tercer ensayo utilizando las condiciones de ensayo originales. Los resultados dudosos de la primera tanda se consideran negativos si el efecto observado no puede confirmarse en ninguna de las dos tandas siguientes. Los resultados dudosos se consideran positivos (hay efecto) si la respuesta puede confirmarse en al menos una tanda más con un incremento de concentración de ± 1 (véase en el punto 55 el procedimiento de interpretación de los datos).

*Cuadro 7*

**Matriz de decisiones según las situaciones posibles**

| Tanda 1 | Tanda 2 | | Tanda 3 | | Decisión | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Situación | Decisión | Situación | Decisión | Situación | Positiva | Negativa |
| Negativa | Confirmar ([a]) | Negativa | Parar | | | X |
| Negativa | Confirmar ([a]) | Positiva | Afinar ([b]) | Negativa | | X |
| Dudosa ([c]) | Afinar ([b]) | Negativa | Confirmar ([a]) | Negativa | | X |
| Dudosa ([c]) | Afinar ([b]) | Negativa | Confirmar ([a]) | Positiva | X | |
| Dudosa ([c]) | Afinar ([b]) | Positiva | | | X | |
| Positiva | Afinar ([b]) | Negativa | Confirmar ([a]) | Positiva | X | |

▼M5

| Tanda 1 | Tanda 2 | | Tanda 3 | | Decisión | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Situación | Decisión | Situación | Decisión | Situación | Positiva | Negativa |
| Negativa | Confirmar [a] | Positiva | Afinar [b] | Positiva | X | |
| Positiva | Afinar [b] | Positiva | Parar | | X | |

[a] Confirmar la tanda anterior con el mismo diseño experimental.
[b] Hacer otra tanda con intervalos semilogarítmicos de concentración, englobando la concentración que había dado resultados significativamente diferentes en el experimento anterior.
[c] El factor multiplicador del cambio es estadísticamente diferente de forma significativa respecto al resultado del CD a una sola concentración.

**Control de calidad de la placa de ensayo**

48. Además de los criterios de la placa de control de calidad, deben cumplirse otros criterios de calidad (indicados en el cuadro 8) que se refieren a la variación aceptable entre pocillos replicados, experimentos replicados, la linealidad y la sensibilidad de los sistemas de medición de hormonas, la variabilidad entre mediciones replicadas de hormonas de la misma muestra, y el porcentaje de recuperación de las hormonas añadidas, tras la extracción del medio (en su caso, véase el punto 30 en cuanto a los requisitos de la extracción). Para ser considerados en una evaluación posterior, los datos deben quedar dentro de los intervalos aceptables definidos para cada parámetro. Si dichos criterios no se cumplen, la hoja de cálculo debe recoger que la muestra en cuestión no cumplía los criterios de control de calidad, y la muestra debe volver a analizarse o bien se elimina del conjunto de datos.

*Cuadro 8*

**Bandas y/o variaciones (%) aceptables de los parámetros de la placa de ensayo del ensayo H295R.**

LDC: límite de cuantificación del sistema de medición hormonal. CV: coeficiente de variación; CD: control del disolvente; DPM: desintegraciones por minuto

| | Comparación | T | E2 |
|---|---|---|---|
| Producción basal de hormona en los CD | Factor multiplicador respecto al LDC | ≥ 5 veces | ≥ 2,5 veces |
| Experimentos de exposición — CV de los CD dentro de una placa (pocillos replicados) | Concentraciones absolutas | ≤ 30 % | ≤ 30 % |
| Experimentos de exposición — CV de los CD entre placas (experimentos replicados) | Factor multiplicador del cambio | ≤ 30 % | ≤ 30 % |
| Sistema de medición hormonal –Sensibilidad | Factor de reducción detectable respecto al CD | ≥ 5 veces | ≥ 2,5 veces |
| Sistema de medición hormonal — CV de de las medidas replicadas de los CD [a] | Concentraciones absolutas | ≤ 25 % | ≤ 25 % |
| Extracción del medio — Recuperación del patrón interno de $^{3}H$ (en su caso) | DPM | ≥ 65 % del valor nominal | |

[a] Se refiere a las medidas replicadas de la misma muestra.

▼M5

ANÁLISIS DE LOS DATOS E INFORME

**Análisis de los datos**

49. Para evaluar el aumento/descenso relativo de la producción hormonal alterada químicamente, los resultados deben normalizarse teniendo en cuenta el valor medio de los controles de disolvente de cada placa de ensayo, y los resultados se expresan como cambios respecto al control de disolvente de cada placa de ensayo. Todos los datos se deben expresar como media ± 1 desviación típica (DT).

50. Deben incluirse en el análisis de datos tan solo los datos hormonales de los pocillos donde la citotoxicidad haya sido inferior al 20 %. Los cambios relativos deben calcularse de la manera siguiente:

**Cambio relativo** = (concentración hormonal en cada pocillo) ÷ (concentración hormonal media en todos los pocillos de control del disolvente).

51. Si la inspección visual del pocillo o el ensayo de viabilidad celular/citotoxicidad descrito en el punto 42 parecen indicar un aumento del número de células, habrá que verificar dicho aumento aparente. Si se confirma el aumento del número de células, este extremo debe reflejarse en el informe del ensayo.

52. Antes de llevar a cabo análisis estadísticos, deben evaluarse las hipótesis de normalidad y de homogeneidad de la varianza. La normalidad debe evaluarse utilizando gráficos de probabilidad normal u otro método estadístico apropiado (por ejemplo, la prueba de Shapiro-Wilk). Si los datos (factor multiplicador del cambio) no se distribuyen normalmente, debe intentarse su transformación para aproximarlos a una distribución normal. Si los datos se distribuyen normalmente o se aproximan a una distribución normal, las diferencias entre los grupos a los que se han administrado las concentraciones de sustancia problema y los grupos de control del disolvente deben analizarse mediante una prueba paramétrica (por ejemplo, la prueba de Dunnett) tomando la *concentración* como variable independiente y la *respuesta* (factor multiplicador del cambio) como dependiente. Si los datos no se distribuyen normalmente, debe utilizarse una prueba no paramétrica adecuada (por ejemplo, la prueba de Kruskal Wallis, la prueba de rango de muchos a uno de Steel). Las diferencias se consideran significativas a $p \leq 0{,}05$. Las evaluaciones estadísticas se hacen sobre la base de los valores medios de cada pocillo, que representan puntos de datos replicados independientes. Se prevé que, debido al amplio espaciado entre las dosis en la primera tanda (escala logarítmica), en muchos casos no será posible describir una relación clara entre concentración y respuesta cuando las dos dosis mayores se encuentren en la porción lineal de la curva sigmoidea. Por lo tanto, para la primera tanda o para cualquier otro conjunto de datos en los que se dé esta condición (por ejemplo, en los casos en que no pueda estimarse una eficacia máxima) se aplicará un análisis estadístico de variable fijada de tipo I, tal y como se describe anteriormente.

53. Si hay más de dos puntos de datos en la porción lineal de la curva y si pueden calcularse las eficacias máximas (como se prevé con algunas segundas tandas que se llevan a cabo utilizando espaciados semilogarítmicos entre las concentraciones de exposición), deben utilizarse cálculos con probit, logit u otros modelos adecuados de regresión para calcular las concentraciones eficaces (por ejemplo, CE50 y CE20).

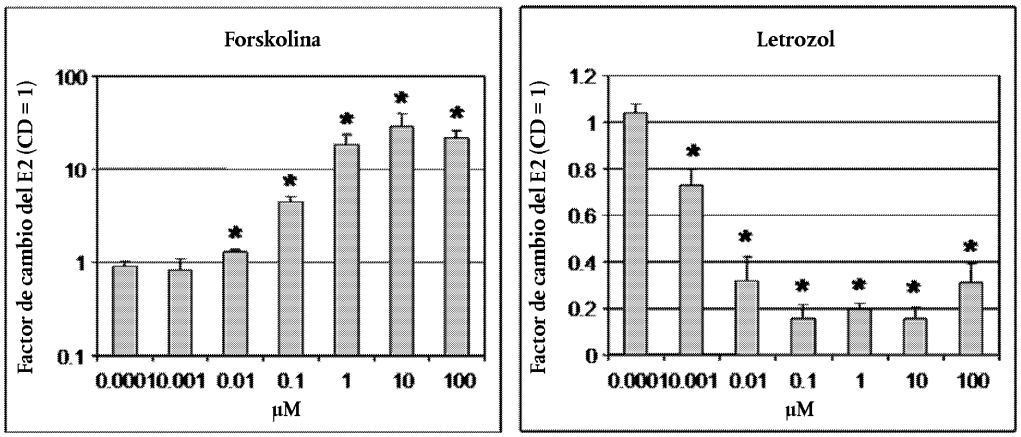
54. Los resultados se deben dar en forma de gráficos (gráficos de barras que representen la media ± 1 DT) y de cuadros (LOEC/NOEC, dirección del efecto, y magnitud de la respuesta máxima que forma parte de la banda de dosis-respuesta de los datos) (en la figura 3 se ofrece un ejemplo). La evaluación de los datos se considera válida solo si se basa al menos en dos tandas llevadas a cabo de forma independiente. Un experimento o tanda se considera independiente si se ha llevado a cabo en una fecha diferente, utilizando un nuevo conjunto de soluciones y de controles. El intervalo de concentraciones utilizadas en las tandas 2 y 3 (en su caso) puede adaptarse sobre la base de los resultados de la tanda 1 para definir mejor la banda de dosis-respuesta que contiene el LOEC (véase el punto 47).

▼M5

*Figura 3*

**Ejemplo de presentación y evaluación de los datos obtenidos durante la realización del ensayo H295R en forma de gráfico y de cuadro.**

Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto al control de disolvente ($p < 0,05$). LOEC: concentración mínima con efecto observado; Factor multiplicador máximo del cambio: magnitud máxima de la respuesta observada a cualquier concentración respecto a la respuesta media del control de disolvente (= 1)




| Sustancia | LOEC | Factor multiplicador máximo del cambio |
|---|---|---|
| Forskolina | 0,01 | 29 veces |
| Letrozol | 0,001 | 0,15 veces |

**Procedimiento de interpretación de los datos**

55. Se considera que una sustancia problema es positiva si el factor multiplicador de la inducción es estadísticamente diferente ($p \leq 0,05$) respecto al control del disolvente a dos concentraciones adyacentes en al menos dos tandas independientes (cuadro 7). La sustancia problema se considera negativa a raíz de dos tandas negativas independientes, o de tres tandas cuando dos de ellas son negativas y una es dudosa o positiva. Si los datos generados en tres experimentos independientes no cumplen los criterios de decisión que figuran en el cuadro 7, no es posible interpretar los resultados experimentales. Los resultados correspondientes a concentraciones que superen los límites de solubilidad o a concentraciones citotóxicas no deben incluirse en la interpretación de los resultados.

**Informe del ensayo**

56. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Instalación de ensayo*

— Nombre de la instalación y ubicación;

— Director y demás personal del estudio, con sus responsabilidades en el mismo;

— Fechas de inicio y final del estudio;

▼**M5**

*Sustancia problema, reactivos y controles*

— Identidad (nombre/nº CAS, según proceda), origen, número de lote, pureza, proveedor y caracterización de la sustancia problema, de los reactivos y de los controles;

— Naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes de la sustancia problema;

— Condiciones de almacenamiento y método y frecuencia de la preparación de las sustancias problema, de los reactivos y de los controles;

— Estabilidad de la sustancia problema;

*Células*

— Fuente y tipo de células;

— Número de pases (código de pases) de las células utilizadas en el ensayo;

— Descripción de los procedimientos de mantenimiento de los cultivos celulares;

*Requisitos previos al ensayo, en su caso*

— Descripción y resultados de la prueba de interferencia del sistema de medición hormonal con la sustancia problema;

— Descripción y resultados de las mediciones de la eficacia de la extracción hormonal;

— Curvas patrón y de calibración de todos los ensayos analíticos que se van a realizar;

— Límites de detección correspondientes a los ensayos analíticos seleccionados;

*Condiciones del ensayo*

— Composición de los medios;

— Concentración de la sustancia problema;

— Densidad celular (concentraciones celulares estimadas o medidas a las 24 y a las 48 horas);

— Solubilidad de la sustancia problema (límite de solubilidad, si se ha determinado);

— Tiempo y condiciones de incubación;

*Resultados del ensayo*

— Datos en bruto de cada pocillo de los controles y de las sustancias problema-cada medida replicada, en la forma de los datos originales proporcionados por el instrumento utilizado para medir la producción hormonal (por ejemplo, DO, unidades de fluorescencia, DPM, etc.);

— Validación de la normalidad o explicación de la transformación de los datos;

— Respuestas medias ± 1 desviación típica de cada pocillo medido;

— Datos de citotoxicidad (concentraciones de ensayo que han causado citotoxicidad);

— Confirmación de que se han cumplido los requisitos en materia de control de calidad (CC);

▼M5

— Cambio relativo en comparación con el control de disolvente corregido para tener en cuenta la citotoxicidad;

— Gráfico de barras que indique el cambio relativo (factor multiplicador del cambio) en cada concentración, la desviación típica y la significación estadística según se describe en los puntos 49-54;

*Interpretación de los datos*

— Aplicación del procedimiento de interpretación de los datos a los resultados y discusión de las observaciones;

*Discusión*

— ¿Aporta indicios el estudio en lo que respecta a la posibilidad de que los datos de T/E2 puedan estar influidos por efectos indirectos sobre las vías de los gluco y mineralocorticoides?

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2002), OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos), en el apéndice 2 del capítulo B.54 del presente anexo.

(2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 217, 114-124.

(3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidgenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.

(4) OCDE (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production,* OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, París. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(5) OCDE (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis,* OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, París. Disponible en la dirección: [http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html]

(6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Disponible en la dirección: [http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drp_final_3_29_05.pdf]

(7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.,* 81, 78-89.

(8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* 182, 44-54.

(9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.,* 118: 265-272.

▼**M5**

(10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.,* 17:1137-1148.

(11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.,* 50, 5488-5496.

(12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere,* 80:578-584.

(13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.,* 39:2777-2785.

(14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.,* 17:1137-1148.

(15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* 77, 731-737.

(16) Capítulo B.55 del presente anexo, Bioensayo de Hershberger con ratas: ensayo de cribado a corto plazo de las propiedades (anti)androgénicas.

(17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.,* 2, 222-231.

(18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.,* 65, 55-63.

(19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, Biochemistry. 38:1598-1606.

(20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, J. Appl. Toxicol., 26:484-492.

▼M5

*Apéndice*

DEFINICIONES

**Confluencia**: Cobertura o proliferación que pueden tener las células en el medio de cultivo.

**Sustancia**: Sustancia o mezcla.

**CV**: Coeficiente de variación, que es la relación entre la desviación típica de una distribución y su media aritmética.

**CYP**: Mono-oxigenasas del citocromo P450, que son una familia de genes y de enzimas codificadas por estos, y que participan en la catálisis de una amplia variedad de reacciones bioquímicas, entre las que se incluyen la síntesis y el metabolismo de las hormonas esteroideas.

**DPM**: Desintegraciones por minuto. Es el número de átomos presentes en una determinada cantidad de material radiactivo cuya desintegración se detecta en un minuto.

**E2**: El 17β-estradiol, que es el estrógeno más importante de los mamíferos.

**Células H295R**: Células de adrenocarcinoma humano que tienen las características fisiológicas de las células suprarrenales sin diferenciación zonal de los fetos humanos y que expresan todas las enzimas de la vía de la esteroidogénesis. Pueden conseguirse de la ATCC.

**Medio de congelación**: Se utiliza para congelar las células y mantenerlas congeladas. Consiste en el medio de partida al que se ha añadido BD NuSerum y dimetil-sulfóxido.

**Intervalo lineal**: Rango dentro de la curva patrón de un sistema de medición hormonal en el que los resultados son proporcionales a la concentración del analito presente en la muestra.

**LDC**: Significa «límite de cuantificación» y es la cantidad más pequeña de una sustancia cuya presencia puede distinguirse de su ausencia (valor en blanco), dentro de un límite de confianza establecido. A los efectos de este método, el LDC suele estar definido por el fabricante de los sistemas de ensayo, si no se especifica lo contrario.

**LOEC**: Concentración mínima con efecto observado, que es la concentración más baja a la cual la respuesta del ensayo es estadísticamente diferente de la del control del disolvente.

**NOEC**: Concentración sin efecto observado, que es la mayor concentración estudiada si el ensayo no proporciona respuesta positiva.

**Pase**: Número de veces que se resiembran las células después de la iniciación de un cultivo a partir de un material congelado. Al primer pase que procede del material congelado se le asigna el número 1. Las células que se resiembran una vez se etiquetan como de pase 2, etc.

**PBS**: Solución salina amortiguadora de fosfato de Dulbecco.

**Control de calidad (abreviado a CC)**: Medidas necesarias para garantizar la obtención de datos válidos.

**Placa de control de calidad**: Placa de 24 pocillos que contiene dos concentraciones de los controles positivos y negativos para supervisar el comportamiento de un lote nuevo de células o aportar los controles positivos del ensayo cuando se estudian sustancias problema.

**Tanda**: Experimento independiente que se caracteriza por un nuevo conjunto de soluciones y de controles.

▼**M5**

**Medio de partida**: Base para la preparación de los demás reactivos. Consiste en una mezcla 1:1 del medio de Eagle modificado por Dulbecco y de mezcla nutritiva F-12 de Ham (DMEM/F12) en solución amortiguadora HEPES 15 mM sin rojo de fenol ni bicarbonato de sodio. El bicarbonato de sodio se añade como amortiguador, véase el apéndice II del informe de validación (4).

**Medio suplementado**: Medio de partida más BD Nu-Serum e ITS+ premium mix; véase el apéndice II del informe de validación (4).

**Esteroidogenesis**: Vía de síntesis que lleva del colesterol a las distintas hormonas esteroideas. Varios intermedios de la síntesis esteroidea, como la progesterona y la testosterona, son importantes hormonas por sí mismas, pero también sirven de precursores de otras hormonas que se sintetizan más adelante en la vía.

**T**: Testosterona, uno de los dos más importantes andrógenos de los mamíferos.

**Sustancia problema**: Toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Placa de ensayo**: Placa en la que las células H295R se exponen a las sustancias problema. Las placas de ensayo contienen el control del disolvente y la sustancia problema a siete niveles de concentración por triplicado.

**Tripsina 1X**: Solución diluida de la enzima tripsina, que es una serina-proteasa pancreática, utilizada para liberar las células de una placa de cultivo celular; véase el apéndice III del informe de validación (4).

▼M5

## B.58. ENSAYOS DE MUTACIÓN GÉNICA EN CÉLULAS SOMÁTICAS Y REPRODUCTORAS DE ROEDORES TRANSGÉNICOS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 488 (2013). Hay métodos de ensayo de la UE para una amplia gama de ensayos de mutación *in vitro* que permiten detectar mutaciones génicas o cromosómicas. Se dispone de métodos de ensayo para algunos parámetros *in vivo* (es decir, aberraciones cromosómicas y síntesis de ADN no programada); sin embargo, estos no miden las mutaciones génicas. Los ensayos de mutación en roedores transgénicos (RTG) satisfacen la demanda de ensayos *in vivo* de mutaciones génicas que sean prácticos y estén ampliamente disponibles.

2. Los ensayos de mutación en RTG han sido objeto de una extensa revisión (24)(33). Utilizan ratas y ratones transgénicos que contienen múltiples copias de vectores lanzadera de plásmidos o de bacteriófagos, integradas en los cromosomas. Los transgenes contienen genes marcadores para la detección de diversos tipos de mutaciones inducidas *in vivo* por las sustancias problema.

3. Las mutaciones que se producen en los roedores se detectan a través de la recuperación del transgén y del análisis del fenotipo del gen marcador en un hospedador bacteriano que carece de dicho gen marcador. Los ensayos de mutación génica en RTG miden las mutaciones inducidas en genes genéticamente neutros recuperados de prácticamente cualquier tejido de los roedores. Estos estudios, por tanto, soslayan muchas de las actuales limitaciones relativas al estudio de las mutaciones génicas *in vivo* en genes endógenos (por ejemplo, la gama limitada de tejidos adecuados para el análisis, la selección positiva/negativa frente a las mutaciones).

4. La ponderación de las pruebas sugiere que los transgenes responden a los mutágenos de manera similar a la de los genes endógenos, especialmente por lo que se refiere a la detección de sustituciones de un par de bases, desplazamiento del marco de lectura, y pequeñas deleciones e inserciones (24).

5. Los talleres internacionales sobre ensayos de genotoxicidad (International Workshops on Genotoxicity Testing, IWGT) han refrendado la inclusión de los ensayos de mutación génica en RTG para la detección *in vivo* de mutaciones génicas, y han recomendado un protocolo para su aplicación (15)(29). El presente método se basa en estas recomendaciones. En apoyo del presente protocolo se pueden encontrar más análisis en (16).

6. Se prevé que en el futuro se pueda combinar un ensayo de mutación génica en RTG con un estudio de toxicidad por administración continuada (método de ensayo B. 7 del presente anexo). Sin embargo, hacen falta datos para garantizar que la sensibilidad de los ensayos de mutación génica en RTG no se ve afectada por la diferencia del plazoentre el final del período de administración y el momento del muestreo, plazo que es de un día en el estudio de toxicidad por administración continuada, más breve que el plazo de tres días utilizado en los ensayos de mutación génica en RTG. También hacen falta datos que indiquen que el comportamiento del ensayo por administración continuada no se ve afectado negativamente por utilizar una cepa de roedores transgénicos en lugar de una cepa de roedores tradicionales. Cuando se disponga de estos datos, se actualizará el presente método de ensayo.

7. Las definiciones de los términos clave figuran en el apéndice.

▼M5

CONSIDERACIONES INICIALES

8. Los ensayos de mutación génica en RTG de los que se dispone de suficientes datos para avalar su utilización en el presente método de ensayo son los siguientes: ratón con el bateriófago *lacZ* (Muta™Mouse); ratón con el plásmido *lacZ;* ratón y rata *gpt* delta (*gpt* y Spi$^-$); ratón y rata *lacI* (Big Blue®), llevados a cabo en condiciones normales. Además, el ensayo de selección positiva *cII* puede utilizarse para evaluar las mutaciones en los modelos Big Blue® y Muta™Mouse. La mutagénesis en los modelos de RTG se evalúa normalmente como la frecuencia de mutantes; cuando sea preciso, sin embargo, el análisis molecular de las mutaciones puede proporcionar información adicional (véase el punto 24).

9. Estos ensayos de mutación génica *in vivo* en roedores están especialmente indicados para evaluar el peligro mutagénico, ya que las respuestas de los ensayos dependen del metabolismo *in vivo,* de la farmacocinética, de los procesos de reparación del ADN, y de la síntesis de ADN translesión, si bien dichos factores pueden variar según la especie, según el tejido y según los tipos de lesiones del ADN. Un ensayo *in vivo* de mutación génica es útil para ahondar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro,* y para el seguimiento de los resultados de ensayos que utilizan otros parámetros *in vivo* (24). Además de estar asociada como causa de la inducción del cáncer, la mutación génica es un parámetro importante para la predicción de enfermedades distintas del cáncer basadas en mutaciones en tejidos somáticos (12)(13), así como de enfermedades transmitidas por las células germinales.

10. Si hay indicios de que la sustancia problema o un metabolito relevante no va a alcanzar ninguno de los tejidos de interés, no es apropiado llevar a cabo un ensayo de mutación génica en RTG.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. En los ensayos descritos en el punto 8, el gen diana procede de una bacteria o de un bacteriófago y el medio para recuperarlo del ADN genómico del roedor es la incorporación del transgén a un vector de lanzadera de bacteriófagos λ o de plásmidos. El procedimiento implica la extracción de ADN genómico del tejido del roedor de interés, el tratamiento *in vitro* del ADN genómico (es decir, la encapsidación de los vectores λ, o la ligadura y electroporación de plásmidos para recuperar el vector de lanzadera), y la posterior detección de las mutaciones en hospedadores bacterianos en condiciones adecuadas. Los ensayos emplean transgenes neutros que son fácilmente recuperables de la mayor parte de los tejidos.

12. El experimento de mutación génica en RTG de base implica el tratamiento de los roedores con una sustancia a lo largo de un plazo. Las sustancias pueden administrarse por cualquier vía adecuada, incluida la implantación (por ejemplo, ensayos de productos sanitarios). El plazo total durante el cual se administra la sustancia a un animal se denomina período de administración. La administración suele ir seguida de un período de tiempo, antes del sacrificio de los animales, durante el cual no se administra la sustancia y en el cual se fijan las lesiones de ADN no reparadas convirtiéndose en mutaciones estables. En la bibliografía, este período recibe diversas denominaciones, como tiempo de manifestación, tiempo de fijación o tiempo de expresión; este período termina en el momento del muestreo (15)(29). Después de que se sacrifique el animal, se aísla el ADN genómico del tejido o tejidos de interés y se purifica.

▼M5

13. Normalmente se agregan los datos obtenidos con un solo tejido por animal a partir de múltiples encapsidaciones/ligaduras, y la frecuencia de mutantes se evalúa en general utilizando un total de entre $10^5$ y $10^7$ unidades formadoras de calvas o formadoras de colonias. Cuando se utilicen métodos de selección positiva, el total de unidades formadoras de calvas se determinará con un conjunto separado de placas no selectivas.

14. Se han elaborado métodos de selección positiva para facilitar la detección de mutaciones en el gen *gpt* [ratón y rata *gpt* delta, fenotipo *gpt*⁻ (20)(22)(28)] y en el gen *lacZ* [Muta™Mouse o ratón con el plásmido *lacZ* (3)(10)(11)(30)], mientras que las mutaciones del gen *lacI* en animales Big Blue® se detectan mediante un método no selectivo que identifica las mutaciones mediante la generación de calvas de color (azul). También se dispone de una metodología de selección positiva para detectar las mutaciones puntuales que se producen en el gen *cII* del vector de lanzadera del bacteriófago λ [ratón o rata Big Blue®, y Muta™Mouse (17)] y las mutaciones de deleción en los genes λ *red* y *gam* [selección Spi⁻ en ratón y rata *gpt* delta (21)(22)(28)]. La frecuencia de mutantes se calcula dividiendo el número de calvas/plásmidos que contienen mutaciones en el transgén por el número total de calvas/plásmidos recuperados de la misma muestra de ADN. En los estudios de mutación génica en RTG, el parámetro comunicado es la frecuencia de mutantes. Además, la frecuencia de mutación puede determinarse como la fracción de células que portan mutaciones independientes; este cálculo requiere que se apliquen correcciones para tener en cuenta la expansión clonal secuenciando los mutantes recuperados (24).

15. Las mutaciones objeto de puntuación en los ensayos de mutación puntual en *lacI, lacZ, cII* and *gpt* consisten principalmente en mutaciones de sustitución de un par de bases, en mutaciones de desplazamiento del marco de lectura y en pequeñas inserciones y deleciones. La proporción relativa de estos tipos de mutación entre las mutaciones espontáneas es similar a la observada en el gen *Hprt* endógeno. Las grandes deleciones solo se detectan con los ensayos de selección de Spi⁻ y del plásmido *lacZ* (24). Las mutaciones de interés son las mutaciones *in vivo* que se producen en el ratón o en la rata. Las mutaciones *in vitro* y *ex vivo,* que pueden darse durante la recuperación, replicación o reparación de los bacteriófagos/plásmidos, son relativamente raras, y en algunos sistemas pueden identificarse específicamente, o excluirse del sistema de hospedador bacteriano/selección positiva.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparativos**

*Selección de la especie animal*

16. Actualmente se dispone de una variedad de modelos para la detección de mutaciones génicas en ratones transgénicos, y estos sistemas ya se han utilizado más ampliamente que los modelos de ratas transgénicas. Cuando la rata sea un modelo claramente más adecuado que el ratón (por ejemplo, para investigar el mecanismo de la carcinogénesis de un tumor que solo se ha visto en ratas, para establecer una correlación con un estudio de toxicidad en ratas, o si se sabe que el metabolismo de las ratas es más representativo del metabolismo humano), debe considerarse la utilización de modelos de ratas transgénicas.

*Condiciones de alojamiento y alimentación*

17. Lo ideal es que el local de los animales de experimentación esté a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser, como mínimo, del 30 % y preferentemente no superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local, debe procurarse que esté comprendida entre el 50 y el 60 %. La iluminación debe ser artificial, con una secuencia diaria de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Puede proporcionarse una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua a voluntad. La

▼M5

elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia problema si se administra por esta vía. Los animales deben alojarse en grupos pequeños (no más de cinco animales juntos) del mismo sexo si no se espera una conducta agresiva. Los animales pueden alojarse por separado, si está justificado científicamente.

*Preparación de los animales*

18. Se asignan aleatoriamente a los grupos de control y de tratamiento animales sanos, adultos jóvenes, maduros sexualmente (8-12 semanas de edad al inicio del tratamiento). Los animales se identifican inequívocamente y se aclimatan a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días. Las jaulas se colocan de manera que los posibles efectos debidos a la puesta de los animales en las mismas sean mínimos. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder de ± 20 % del peso medio de cada sexo.

*Preparación de las dosis*

19. Las sustancias problema sólidas deben disolverse o suspenderse en disolventes o vehículos adecuados, o mezclarse con la dieta o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Las sustancias problema líquidas pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En lo que respecta a la exposición por inhalación, las sustancias problema pueden administrarse en forma de gas, de vapor o de aerosol sólido o líquido, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas. Han de emplearse preparaciones recientes de la sustancia problema, salvo que haya datos de estabilidad que demuestren que es posible conservarlas.

**Condiciones del ensayo**

*Disolvente o vehículo*

20. El disolvente o vehículo no debe producir efectos tóxicos a los volúmenes de dosis empleados, y no debe haber ninguna sospecha de que reaccione químicamente con la sustancia problema. Si se emplean disolventes o vehículos poco conocidos, debe disponerse de información de referencia que avale su compatibilidad. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso.

*Controles positivos*

21. Normalmente deben utilizarse animales de control positivo en paralelo. Sin embargo, en el caso de laboratorios que hayan demostrado su competencia (véase el punto 23) y utilicen estos ensayos sistemáticamente, para confirmar el éxito del método es posible incluir en cada estudio el ADN de animales de control positivo tratados anteriormente. Este ADN de experimentos anteriores debe obtenerse de la misma especie y de los mismos tejidos de interés, y estar almacenado correctamente (véase el punto 36). Cuando se utilicen controles positivos en paralelo, no es necesario administrarlos por la misma vía que la sustancia problema; sin embargo, debe tenerse la certeza de que los controles positivos inducen mutaciones en uno o varios de los tejidos de interés para la sustancia problema. Las dosis de las sustancias de control positivo deben seleccionarse de manera que generen efectos débiles o moderados que sirvan para evaluar críticamente el comportamiento y la sensibilidad del ensayo. En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de sustancias de control positivo y algunos de sus tejidos diana.

▼M5

*Cuadro 1*

**Ejemplos de sustancias de control positivo y algunos de sus tejidos diana**

| Sustancia de control positivo y nº CAS | Nombre EINECS y nº EINECS | Características | Tejido diana de la mutación | |
|---|---|---|---|---|
| | | | Ratas | Ratones |
| N-etil-N-nitrosourea [Nº CAS: 759-73-9] | N-etil-N-nitrosourea [212-072-2] | Mutágeno de acción directa | Hígado, pulmón | Médula ósea, colon, epitelio del colon, intestino, hígado, pulmones, bazo, riñones, células de la granulosa del ovario, células germinales masculinas |
| Carbamato de etilo (uretano) [Nº CAS: 51-79-6] | Uretano [200-123-1] | Mutágeno, requiere metabolismo pero tiene solo efectos débiles | | Médula ósea, parte anterior del estómago, intestino delgado, hígado, pulmones, bazo |
| 2,4-Diaminotolueno [nº CAS 95-80-7] | 4-Metil-m-fenilendiamina [202-453-1] | Mutágeno, requiere metabolismo, también positivo en el ensayo $Spi^-$ | Hígado | Hígado |
| Benzo[e]pireno [nº CAS 50-32-8] | Benzo[def]criseno [200-028-5] | Mutágeno, requiere metabolismo | Hígado, epiplones | Médula ósea, mama, colon, parte anterior del estómago, estómago glandular, hígado, corazón, pulmones, células germinales masculinas |

*Controles negativos*

22. Deben incluirse controles negativos en cada momento de muestreo, tratados únicamente con el disolvente o vehículo, pero por lo demás de la misma manera que los grupos de tratamiento. Si no se tienen datos de control, históricos o publicados, que indiquen que el disolvente/vehículo elegido no induce ningún efecto perjudicial ni mutagénico, deben incluirse también en cada momento de muestreo controles sin tratar, a fin de establecer que es aceptable el control del vehículo.

*Verificación de la competencia del laboratorio*

23. Debe establecerse la competencia en estos ensayos demostrando la capacidad de reproducir los resultados previstos a partir de los datos publicados (24) en relación con: 1) la frecuencia de mutantes con sustancias de control positivo (incluidas las respuestas débiles) como las que figuran en el cuadro 1, con no mutágenos, y con controles del vehículo; y 2) la recuperación de transgenes a partir del ADN genómico (por ejemplo, eficacia de la encapsidación).

**Secuenciación de los mutantes**

24. A efectos normativos, no es necesario secuenciar el ADN de los mutantes, en particular en caso de que se obtenga un resultado positivo o negativo claro. Sin embargo, los datos de secuenciación pueden ser útiles si se observa una elevada variación entre individuos. En estos casos, la secuenciación puede utilizarse para excluir la posibilidad de «botes» o sucesos

▼M5

clonales determinando la proporción de mutantes individuales de un tejido concreto. La secuenciación de unos diez mutantes por tejido y por animal debe ser suficiente para determinar simplemente si los mutantes clonales contribuyen a la frecuencia de mutantes; puede ser necesario llegar a secuenciar 25 mutantes para corregir matemáticamente la frecuencia de mutantes en cuanto a la clonalidad. También puede pensarse en realizar la secuenciación de mutantes cuando se encuentren pequeños aumentos de la frecuencia de mutantes (es decir, que esta sea muy poco superior a los valores del control sin tratar). La presencia de un efecto mutagénico puede verse reforzada si se encuentran diferencias en el espectro de mutantes entre las colonias mutantes de los animales tratados y las de los animales sin tratar (29). Asimismo, los espectros de mutación pueden ser útiles para elaborar hipótesis sobre mecanismos. Cuando la secuenciación vaya a incluirse como parte del protocolo del estudio, debe ponerse especial cuidado en el diseño de dichos estudios, en particular en lo que se refiere al número de mutantes secuenciados por muestra, para alcanzar una potencia adecuada de acuerdo con el modelo estadístico utilizado (véase el punto 43).

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

25. El número de animales de cada grupo debe determinarse previamente de forma que sea suficiente para proporcionar la potencia estadística necesaria a fin de detectar, como mínimo, una duplicación de la frecuencia de mutantes. Los grupos consistirán en un mínimo de cinco animales; no obstante, si la potencia estadística es insuficiente, debe aumentarse el número de animales en la medida necesaria. Normalmente deben utilizarse animales machos. Puede haber casos en que esté justificado utilizar solo hembras; por ejemplo, cuando se realicen pruebas de medicamentos específicos para mujeres, o cuando se investigue el metabolismo específico de la mujer. Si existen diferencias importantes entre sexos en términos de toxicidad o metabolismo, será necesario utilizar tanto machos como hembras.

**Período de administración**

26. Sobre la base de observaciones que demuestran que las mutaciones se acumulan con cada tratamiento, es necesario aplicar un régimen de administración continuada, con tratamientos diarios durante un período de 28 días. En general, esto se considera aceptable tanto para producir una acumulación suficiente de mutaciones debidas a mutágenos débiles, como para conseguir un tiempo de exposición adecuado que permita detectar las mutaciones en los órganos de proliferación lenta. Otros regímenes de tratamiento pueden ser apropiados para algunas evaluaciones; en tal caso, tienen que justificarse científicamente en el protocolo. Los tratamientos no deben ser más breves que el tiempo necesario para la completa inducción de todas las enzimas de metabolización pertinentes, y los tratamientos más cortos pueden requerir el uso de múltiples momentos de muestreo que sean idóneos para órganos con diferentes velocidades de proliferación. En cualquier caso, toda la información disponible (por ejemplo, sobre toxicidad general o sobre metabolismo y toxicocinética) debe utilizarse para justificar un protocolo, especialmente cuando este no se atiene a las citadas recomendaciones normales. Si bien pueden incrementar la sensibilidad, el recurrir a tratamientos de más de 8 semanas de duración debe explicarse de forma clara y justificada, ya que los tratamientos largos pueden provocar un aparente incremento de la frecuencia de mutantes debido a la expansión clonal (29).

**Dosis**

27. Las dosis deben basarse en los resultados de un estudio de determinación de la gama de dosis en el que se determine la toxicidad general utilizando la misma vía de exposición, o bien en los resultados de estudios anteriores de toxicidad subaguda. Para la determinación de la gama de dosis pueden utilizarse animales no transgénicos de la misma cepa de roedores. En el ensayo principal, a fin de obtener información sobre la relación dosis-respuesta, para que el estudio sea completo debe incluir un grupo de control

▼M5

negativo (véase el punto 22) y un mínimo de tres dosis debidamente espaciadas, excepto en caso de que se haya utilizado la dosis límite (véase el punto 28). La dosis superior debe representar la dosis máxima tolerada (DMT). Esta DMT se define como la dosis que produce signos de toxicidad tales que, si se administrara una dosis superior según el mismo protocolo de administración, resultaría probablemente letal. Las sustancias que tienen actividades biológicas específicas a dosis bajas no tóxicas (tales como las hormonas y los mitógenos) y las sustancias que presentan saturación de las propiedades toxicocinéticas pueden constituir excepciones para los criterios de determinación de las dosis y deben evaluarse caso por caso. La gama de dosis utilizada deberá abarcar desde la toxicidad máxima hasta una toxicidad escasa o nula.

**Prueba límite**

28. Si los experimentos destinados a determinar la gama de dosis, o los datos existentes procedentes de cepas relacionadas de roedores, indican que un régimen de tratamiento con, como mínimo, la dosis límite (véase más adelante) no produce efectos tóxicos observables, y si no es previsible que se produzca genotoxicidad sobre la base de los datos de sustancias estructuralmente relacionadas, entonces podrá no considerarse necesario realizar un estudio completo con tres niveles de dosis. Para un período de administración de 28 días (es decir, 28 tratamientos diarios), la dosis límite es de 1 000 mg/kg peso corporal al día. Para períodos de administración de 14 días o menos, la dosis límite es de 2 000 mg/kg peso corporal al día (las posologías que se aparten del régimen de 28 tratamientos diarios deben justificarse científicamente en el protocolo; véase el punto 26).

**Administración de las dosis**

29. La sustancia problema suele administrarse por vía oral forzada mediante sonda gástrica o con una cánula de intubación adecuada. En general, a la hora de diseñar el ensayo debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por consiguiente, puede ser aceptable, siempre que se justifique, utilizar otras vías de exposición (tales como el agua de bebida, la inyección subcutánea o intravenosa, la vía tópica, la inhalación, la administración intratraqueal, los alimentos, o la implantación). No se recomienda la inyección intraperitoneal, ya que no es una vía fisiológicamente pertinente para la exposición humana. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por vía oral forzada o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. El volumen no debe superar los 2 ml/100 g de peso corporal. El uso de volúmenes superiores a este deberá justificarse. Excepto en el caso de sustancias irritantes o corrosivas que provoquen normalmente efectos exacerbados a concentraciones superiores, la variabilidad del volumen de ensayo debe reducirse al mínimo ajustando la concentración para que el volumen sea constante en todas las dosis.

**Momento del muestreo**

*Células somáticas*

30. El momento del muestreo es una variable crítica, ya que viene determinado por el período necesario para que las mutaciones queden fijadas. Este período depende de cada tejido y parece estar relacionado con la velocidad de renovación de la población celular; así, la médula ósea y el intestino responden rápidamente, mientras que el hígado es mucho más lento. Un compromiso adecuado para la medición de la frecuencia de mutantes en tejidos que proliferan tanto deprisa como despacio es el de 28 tratamientos diarios consecutivos (como se indica en el punto 26), con la realización del muestreo tres días después del último tratamiento, aunque la frecuencia máxima de mutantes puede no manifestarse en estas condiciones en los tejidos de proliferación lenta. Si son de particular importancia los tejidos de proliferación lenta, puede ser más adecuado hacer el muestreo después, a los 28 días de haber acabado el período de administración de 28 días (16)(29). En estos casos, el momento del muestreo posterior sustituiría al muestreo a los tres días, y exigiría una justificación científica.

▼M5

*Células germinales*

31. Los ensayos con RTG son adecuados para el estudio de la inducción de mutaciones génicas en células germinales masculinas (7)(8)(27), en las que están bien definidos el calendario y la cinética de la espermatogénesis (27). El bajo número de óvulos disponible para el análisis, incluso después de una superovulación, y el hecho de que no haya síntesis de ADN en el ovocito, impiden la determinación de mutaciones en las células germinales femeninas utilizando ensayos transgénicos (31).

32. Los momentos del muestreo para las células germinales masculinas deben seleccionarse de forma que se tomen muestras de la gama de tipos de células expuestas a lo largo de todo el desarrollo de las células germinales, y que la fase diana del muestreo haya recibido una suficiente exposición. El tiempo necesario para que las células germinales en desarrollo pasen de la fase de espermatogonios a la de esperma maduro que alcanza el conducto deferente/cola del epidídimo es de unos 49 días en el caso del ratón (36) y de unos 70 días en el de la rata (34)(35). Tras una exposición de 28 días con un plazo posterior de tres días antes de realizar el muestreo, el esperma acumulado recogido del conducto deferente/cola del epidídimo (7)(8) representa a la población de células expuestas durante aproximadamente la segunda mitad de la espermatogénesis, que incluye los períodos meiótico y postmeiótico, pero no el período de espermatogonio o célula precursora. Para tomar muestras adecuadas de células del conducto deferente/cola del epidídimo que eran espermatogonios durante el período de exposición, hace falta un muestreo adicional cuando hayan pasado al menos siete semanas (ratones) o diez semanas (ratas) desde el final del tratamiento.

33. Las células extraídas de los túbulos seminíferos después de un régimen de 28 + 3 días comprenden una población mixta enriquecida con todas las fases de las células germinales en desarrollo (7)(8). El muestreo de estas células para la detección de mutaciones génicas no proporciona una evaluación tan precisa de las fases en las que se inducen las mutaciones de las células germinales como la que puede conseguirse con el muestreo de los espermatozoides del conducto deferente/cola del epidídimo (ya que las células germinales recogidas de los túbulos son de diversos tipos, y habrá algunas células somáticas que contaminen a esta población celular). Sin embargo, el muestreo de las células de los túbulos seminíferos además del de los espermatozoides del conducto deferente/cola del epidídimo después de solo un régimen de muestreo de 28 + 3 días incluiría en cierta medida las células expuestas durante la mayoría de las fases del desarrollo de las células germinales, y podría ser útil para detectar ciertos mutágenos de las células germinales.

**Observaciones**

34. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se registrará el estado de salud de los animales. Al menos dos veces al día, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. Deben pesarse todos los animales al menos una vez por semana y en el momento del sacrificio. El consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. Si la sustancia problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie el agua y al menos una vez por semana. Los animales que presenten signos de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse antes de que termine el período del ensayo (23).

▼M5

**Recogida de tejidos**

35. Debe definirse claramente la justificación de la recogida de tejidos. Teniendo en cuenta que es posible estudiar la inducción de mutaciones en prácticamente cualquier tejido, la selección de los tejidos que van a recogerse ha de basarse en el motivo de la realización del estudio y en los eventuales datos disponibles sobre mutagenicidad, carcinogenicidad o toxicidad de la sustancia problema. Entre los factores importantes que deben considerarse están la vía de administración (sobre la base de la probable vía o vías de exposición humana), la distribución tisular prevista y el posible mecanismo de acción. A falta de información de base, deben recogerse varios tejidos somáticos que puedan ser de interés. Estos deben ser representativos de tejidos de proliferación rápida, de los de proliferación lenta y de los del lugar de contacto. Por otra parte, deben recogerse espermatozoides del conducto deferente/cola del epidídimo y células germinales en desarrollo de los túbulos seminíferos (como se describe en los puntos 32 y 33), y reservarse por si en el futuro es necesario hacer estudios de mutagenicidad en células germinales. Debe obtenerse el peso de los órganos y, en el caso de los órganos grandes, hay que recoger la misma zona de todos los animales.

**Almacenamiento de tejidos y ADN**

36. Los tejidos (o sus homogeneizados) deben conservarse a una temperatura igual o inferior a – 70 °C y usarse para aislar el ADN en el plazo de cinco años. Lo ideal es que el ADN aislado, conservado en refrigeración a 4 °C en solución amortiguadora adecuada, se utilice en el plazo de un año para el análisis de las mutaciones.

**Selección de tejidos para análisis de mutantes**

37. La selección de tejidos debe basarse en las consideraciones siguientes: 1) la vía de administración o el lugar de primer contacto (por ejemplo, el estómago glandular si la administración es oral, el pulmón si la administración se hace por inhalación, o la piel si se utiliza la aplicación tópica); y 2) los parámetros farmacocinéticos observados en los estudios de toxicidad general, que indican la eliminación, la retención o la acumulación en los tejidos, o los órganos diana de la toxicidad. Cuando se realicen estudios de seguimiento de estudios de carcinogenicidad, deben tenerse en cuenta los tejidos diana de la carcinogenicidad. La selección de los tejidos para el análisis debe maximizar la detección de sustancias que sean mutágenos de acción directa *in vitro,* las rápidamente metabolizadas, las muy reactivas o poco absorbidas, o aquellas cuyo tejido diana esté determinado por la vía de administración (6).

38. A falta de información de base y teniendo en cuenta el lugar de contacto debido a la vía de administración, debe evaluarse la mutagenicidad en el hígado y, al menos, en un tejido que se divida rápidamente (por ejemplo, el estómago glandular o la médula ósea). En la mayoría de los casos, los requisitos anteriores pueden cumplirse analizando dos tejidos seleccionados cuidadosamente, pero en algunos casos pueden ser necesarios tres o más. Si hay razones para una preocupación específica por los efectos sobre las células germinales, incluidas las respuestas positivas en células somáticas, debe evaluarse la inducción de mutaciones en los tejidos de las célulasgerminales.

**Métodos de medición**

39. Se dispone de métodos de laboratorio normales o publicados para la detección de mutantes con los modelos transgénicos recomendados: bacteriófago lambda y plásmido *lacZ* (30); ratón *lacI* (2)(18); ratón *gpt* delta (22); rata *gpt* delta (28); *cII* (17). Las eventuales modificaciones deben justificarse y documentarse adecuadamente. Pueden agregarse los datos de las diversas encapsidaciones, y utilizarse para llegar a un número adecuado de calvas o colonias. No obstante, la necesidad de un número elevado de reacciones de encapsidación para alcanzar el número adecuado de calvas puede ser un

▼M5

signo de la mala calidad del ADN. En estos casos, los datos deben considerarse con precaución, ya que podrían ser poco fiables. El número total óptimo de calvas o colonias por muestra de ADN se rige por la probabilidad estadística de detectar un número suficiente de mutantes con una determinada frecuencia de mutantes espontáneos. En general, hace falta un mínimo de 125 000 a 300 000 calvas si la frecuencia de mutantes espontáneos es del orden de $3 \times 10^{-5}$ (15). Para el ensayo con *lacI* en animales Big Blue®, es importante demostrar que toda la gama de fenotipos de color mutante puede detectarse mediante la inclusión de controles de color adecuado en paralelo con cada siembra en placa. Los tejidos y las consiguientes muestras (elementos) deben procesarse y analizarse utilizando un diseño en bloques, de forma que se procesen juntos los elementos del grupo de control del vehículo/disolvente, los del grupo de control positivo (en caso de utilizarse) o los del ADN de control positivo (en su caso), y los de cada grupo de tratamiento.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

40. Los datos relativos a cada animal se presentarán en forma de cuadro. La unidad experimental es el animal. El informe debe incluir el número total de unidades formadoras de calvas o de unidades formadoras de colonias, el número de mutantes, y la frecuencia de mutantes para cada tejido de cada animal. Si hay varias reacciones de encapsidación/rescate, debe indicarse el número de reacciones por muestra de ADN. Aunque hay que conservar los datos de cada una de las reacciones, solo es necesario recoger en el informe el número total de unidades formadoras de calvas o de colonias. Deben comunicarse en el informe los datos sobre toxicidad y los signos clínicos, según lo establecido en el punto 34. Deben presentarse los resultados de las eventuales secuenciaciones de cada mutante analizado, y deben indicarse los cálculos de la frecuencia de mutación resultante para cada animal y tejido.

**Evaluación estadística e interpretación de los resultados**

41. Son varios los criterios para determinar si un resultado es positivo, tales como el aumento en la frecuencia de mutantes relacionado con la dosis, o un claro aumento en la frecuencia de mutantes en un único grupo tratado con la sustancia problema, en comparación con el grupo de control del disolvente o vehículo. Deben analizarse al menos tres grupos tratados con la sustancia problema a fin de obtener datos suficientes para el análisis de la relación dosis-respuesta. Si bien la consideración principal corresponde a la importancia biológica de los resultados, pueden utilizarse métodos estadísticos adecuados como ayuda para evaluar los resultados del ensayo (4)(14)(15)(25)(26). Las pruebas estadísticas utilizadas deben considerar como unidad experimental al animal.

42. Una sustancia problema cuyos resultados no se ajusten a los criterios anteriores en ningún tejido se considerará no mutagénica en este ensayo. En cuanto a la importancia biológica de un resultado negativo, debe confirmarse la exposición tisular.

43. Para los análisis de secuenciación del ADN, se dispone de una serie de enfoques estadísticos para ayudar a la interpretación de los resultados (1)(5)(9)(19).

44. Para la evaluación de la significación biológica de la respuesta puede servir de orientación considerar si los valores observados se encuentran dentro o fuera del rango del control histórico (32).

▼M5

**Informe del ensayo**

45. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— datos de identificación y nº CAS, si se conoce;

— origen y número de lote, si está disponible;

— naturaleza física y pureza;

— propiedades fisicoquímicas importantes para la realización del estudio;

— estabilidad de la sustancia problema, si se conoce;

*Disolvente o vehículo:*

— justificación de la elección del vehículo;

— solubilidad y estabilidad de la sustancia problema en el disolvente o vehículo, si se conocen;

— preparación de formulaciones para la administración con los alimentos, con el agua de bebida o por inhalación;

— determinaciones analíticas de las formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, concentraciones nominales);

*Animales de experimentación:*

— especie y cepa utilizadas y justificación de la elección;

— número, edad y sexo de los animales;

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.

— peso de cada animal al principio del ensayo, incluido el intervalo de pesos corporales, la media y la desviación típica de cada grupo;

*Condiciones del ensayo:*

— datos de los controles positivos y negativos (vehículo o disolvente);

— datos del estudio de determinación de la gama de dosis;

— justificación de la selección de las dosis;

— detalles de la formulación de la sustancia problema;

— datos sobre la administración de la sustancia problema;

— fundamento de la elección de la vía de administración;

— métodos de determinación de la toxicidad para los animales, incluidos los eventuales análisis histopatológicos o hematológicos y la frecuencia con que se han medido los pesos corporales y se han realizado las observaciones de los animales;

— métodos de comprobación de que la sustancia problema ha alcanzado el tejido diana, o la circulación general, si se obtienen resultados negativos;

▼M5

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día), calculadas a partir del consumo y de la concentración (ppm) de la sustancia problema en los alimentos o en el agua de bebida, en su caso;

— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua;

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y muestreo y justificación de las decisiones;

— método de sacrificio compasivo;

— procedimientos de aislamiento y conservación de los tejidos;

— métodos de aislamiento del ADN genómico de los roedores, rescate del transgén desde el ADN genómico, y transferencia del ADN transgénico a un hospedador bacteriano;

— origen y números de lote de todas las células, equipos y reactivos (cuando proceda);

— métodos de recuento de mutantes;

— métodos de análisis molecular de mutantes y su utilización para la corrección de la clonalidad o para el cálculo de las frecuencias de mutación, en su caso;

*Resultados:*

— estado de los animales antes y a lo largo de la prueba, incluidos los signos de toxicidad;

— peso corporal y de los órganos en el momento del sacrificio;

— respecto a cada tejido o animal, número de mutantes, número de calvas o de colonias evaluadas, frecuencia de mutantes;

— respecto a cada grupo de tejidos o de animales, número de reacciones de encapsidación por muestra de ADN, número total de mutantes, frecuencia media de mutantes, desviación típica;

— relación dosis-respuesta, cuando sea posible;

— respecto a cada tejido o animal, número de mutantes independientes y frecuencia media de mutación, cuando se haya llevado a cabo el análisis molecular de las mutaciones;

— datos sobre los controles negativos en paralelo y los históricos, con las gamas, medias y desviaciones típicas;

— datos del control positivo en paralelo (o del control positivo de ADN no en paralelo);

— determinaciones analíticas, si se dispone de ellas (por ejemplo, concentraciones de ADN utilizadas para la encapsidación, datos de secuenciación del ADN);

— análisis estadísticos y métodos aplicados;

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

▼**M5**

**BIBLIOGRAFÍA**


(1) *Adams,* W.T. and T.R. *Skopek* (1987), 'Statistical *Test* for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol.*, 194: 391-396.

(2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107–112.

(3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature,* 377(6550): 657–659

(4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice' *, Environ. Mol. Mutagen,* 25(3): 246–255.

(5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen,* 28: 405–413.

(6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis,* 14(1): 141–151.

(7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethylnitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. Sci. USA,* 92: 7485-7489.

(8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2-3): 197-212.

(9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics,* 156: 1411–1418.

(10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo', Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 86(20): 7971–7975.

(11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for lacZ-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques,* 14(3): 326, 330.

(12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125-136.

(13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, **705: 96-106**.

(14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis,* 13(3): 249–255.

(15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253-259.

(16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1-6.

▼**M5**

(17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 93(17): 9073–9078.

(18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, in vivo Mutagenicity Testing', Genet. Anal. Tech. Appl., 7(8): 212–218.

(19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', Carcinogenesis, 29(4): 772-778.

(20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using $Spi^-$ and 6-thioguanine Selections', Environ. Mol. Mutagen., 28(4): 465–470.

(21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), '$Spi^-$ Selection: an Efficient Method to Detect γ-ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9–15.

(22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1–2): 191–215.

(23) OCDE (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, Nº 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OCDE, París.

(24) OCDE (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, Nº 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OCDE, París.

(25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', Environ. Mol. Mutagen., 25(3): 231–245.

(26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', Mutation. Res., 388(2–3): 249–289.

(27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', Mutation. Res., 598: 164-193.

(28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of in vivo Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: in vivo Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', Toxicol. Sci., 114(1): 71-78.

(29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res.*, 540: 141-151.

(30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid *lacZ* Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo'* in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II,* Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391–410.

▼**M5**

(31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.

(32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', Mutation Res., doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.

(33) OCDE (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays,* Series on Testing and Assessment, Nº 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OCDE, París.

(34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. Physiol. Rev. 52: 198-236.

(35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M, Wassarman (eds.), Physiology of Reproduction, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.

(36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', Genetica, 122: 25–36.

▼M5

*Apéndice*

DEFINICIONES

**Período de administración**: Período total durante el cual se administra la sustancia problema a los animales.

**Sustitución de un par de bases**: Tipo de mutación que provoca la sustitución de una sola base nucleotídica del ADN por otra base nucleotídica del ADN.

**Cápside**: Cápsula de proteína que rodea a una partícula vírica.

**Sustancia**: Sustancia o mezcla.

**Expansión clonal**: Producción de muchas células a partir de una sola célula (mutante).

**Unidad formadora de colonias**: Medida del número de bacterias viables.

**Concatémero**: Larga biomolécula continua formada por múltiples copias idénticas unidas en serie.

**Sitio cos**: Segmento de doce nucleótidos de ADN monocatenario que existe a ambos extremos del genoma bicatenario del bacteriófago lambda.

**Deleción**: Mutación en la que el genoma pierde uno o varios nucleótidos (secuenciales).

**Electroporación**: Aplicación de impulsos eléctricos para aumentar la permeabilidad de las membranas celulares.

**Gen endógeno**: Gen originario del genoma.

**Variación extrabinomial**: Variabilidad en las estimaciones repetidas de una proporción de la población que es mayor que la que se podría esperar si la población tuviera una distribución binomial.

**Mutación de desplazamiento del marco de lectura**: Mutación genética causada por inserciones o deleciones de un número de nucleótidos que no es divisible exactamente por tres dentro de una secuencia de ADN que codifica para una proteína o péptido.

**Inserción**: Adición de uno o varios pares de bases nucleotídicas a una secuencia de ADN.

**«Bote»**: Gran número de mutantes obtenidos mediante la expansión clonal de una sola mutación.

**Grandes deleciones**: Deleciones en el ADN de más de varias kilobases (que se detectan eficazmente con los ensayos de selección de Spi $^-$ y del plásmido *lacZ*).

**Ligadura**: Unión covalente de dos extremos de las moléculas de ADN mediante una ADN-ligasa.

**Mitógeno**: Sustancia que estimula a una célula para comenzar la división celular, provocando la mitosis (es decir, la división celular).

**Gen neutro**: Gen que no se ve afectado por presiones selectivas positivas ni negativas.

**Encapsidación**: Síntesis de partículas infecciosas de un fago a partir de una preparación de proteínas de la cápside y de la cola del fago y de un concatémero de moléculas de ADN del fago. Se usa comúnmente para encapsidar ADN clonado en un vector lambda (separado por sitios cos) a fin de integrarlo en partículas lambda infecciosas.

**Eficacia de la encapsidación**: Eficacia con la que se recuperan en las bacterias hospedadoras los bacteriófagos encapsidados.

▼M5

**Unidad formadora de calvas**: Medida del número de bacteriófagos viables.

**Mutación puntual**: Término general que designa a las mutaciones que solo afectan a una pequeña secuencia de ADN y que incluyen a las pequeñas inserciones, deleciones y sustituciones de un par de bases.

**Selección positiva**: Método que permite sobrevivir solo a los mutantes.

**Gen marcador**: Gen cuyo producto génico mutante se detecta fácilmente.

**Momento del muestreo**: Final del plazo, antes del sacrificio, durante el cual no se administra la sustancia problema y en el cual se fijan las lesiones de ADN no reparadas convirtiéndose en mutaciones estables.

**Vector de lanzadera**: Vector construido de manera que pueda propagarse en dos especies hospedadoras diferentes; en consecuencia, el ADN insertado en un vector de lanzadera puede ser objeto de examen o de manipulación en dos tipos de células diferentes o en dos organismos diferentes.

**Sustancia problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Transgénico**: Relativo a un organismo cuyo genoma ha sido alterado por la transferencia de uno o varios genes de otra especie.

▼M7

## B.59. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN CHEMICO*: ENSAYO DIRECTO DE REACTIVIDAD PEPTÍDICA (DPRA)

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 442C (2015). Un sensibilizante cutáneo es una sustancia que induce una respuesta alérgica por contacto con la piel, tal como se define en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de la ONU) (1) y en el Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea (UE) ([1]). El presente método de ensayo proporciona un procedimiento *in chemico* (ensayo directo de reactividad peptídica, DPRA por su nombre en inglés) utilizado para apoyar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes de conformidad con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP.

Existe un acuerdo general sobre los principales fenómenos biológicos subyacentes a la sensibilización cutánea. Los actuales conocimientos acerca de los mecanismos biológicos y químicos asociados con la sensibilización cutánea se han resumido en forma de una ruta de resultados adversos (*Adverse Outcome Pathway*, AOP) (2), desde el fenómeno molecular desencadenante, pasando por los fenómenos intermedios, hasta el efecto adverso, en concreto la dermatitis alérgica de contacto en seres humanos o la hipersensibilidad de contacto en roedores. Dentro de la AOP de la sensibilización cutánea, el fenómeno molecular desencadenante es la unión covalente de sustancias electrofílicas a los centros nucleofílicos de las proteínas de la piel.

Tradicionalmente, la evaluación de la sensibilización cutánea se hacía con animales de laboratorio. Los métodos clásicos con cobayas, como el ensayo de maximización con cobayas de Magnusson y Kligman (GMPT) y el ensayo de Buehler [método B.6 (3)], estudian tanto la fase de inducción como la de desencadenamiento de la sensibilización cutánea. Un ensayo con múridos, el ensayo con ganglios linfáticos locales [LLNA, método B.42 (4)], y sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: DA [método B.50 (5)] y el LLNA: BrdU-ELISA [método B.51 (6)], que evalúan exclusivamente la respuesta de inducción, también han conseguido aceptación porque, sobre los ensayos con cobayas, tienen la ventaja de respetar más el bienestar de los animales y de permitir una medición objetiva de la fase de inducción de la sensibilización cutánea.

Más recientemente, algunos métodos farmacodinámicos *in chemico* e *in vitro* se han considerado científicamente válidos para la evaluación del peligro de sensibilización cutánea que representan los productos. Sin embargo, será necesario recurrir a combinaciones de métodos alternativos sin animales (*in silico, in chemico, in vitro*) dentro de un enfoque integrado de pruebas y evaluación (IATA) para poder sustituir por completo los ensayos con animales que se utilizan en la actualidad, habida cuenta de la limitada cobertura en cuanto a los mecanismos de la AOP de cada uno de los métodos de ensayo actualmente disponibles sin animales (2) (7).

Se propone el DPRA para abordar el fenómeno molecular desencadenante de la AOP de la sensibilización cutánea, que es la reactividad proteínica, cuantificando la reactividad de los productos problema frente a péptidos sintéticos modelo que contienen lisina o bien cisteína (8). Los valores de reducción porcentual de los péptidos que contienen cisteína y lisina se utilizan para clasificar las sustancias en una de los cuatro clases de reactividad en apoyo de la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes (9).

([1]) Por media se entiende en todo el documento la media aritmética.

▼M7

El DPRA se ha evaluado en un estudio de validación dirigido por el laboratorio de referencia de la Unión Europea para las alternativas a los ensayos con animales (LRUE del CEVMA) y sujeto posteriormente a revisión *inter pares* independiente por el Comité Científico Consultivo del CEVMA (ESAC) (10) y se considera científicamente válido como parte de un enfoque IATA para apoyar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes con fines de clasificación de peligro y etiquetado. En la bibliografía se recogen ejemplos del uso de datos del DPRA en combinación con otra información (11) (12) (13) (14).

En el apéndice I se dan las definiciones pertinentes.

CONSIDERACIONES INICIALES, APLICABILIDAD Y LIMITACIONES

La correlación de la reactividad proteínica con el potencial de sensibilización cutánea está bien establecida (15) (16) (17). No obstante, dado que la unión a proteínas representa solamente uno de los fenómenos clave, aunque sea el fenómeno molecular desencadenante de la AOP de la sensibilización cutánea, la información sobre la reactividad proteínica obtenida con métodos de ensayo y otros no experimentales puede no ser suficiente por sí sola para llegar a una conclusión sobre la ausencia de potencial de sensibilización cutánea de los productos. Por lo tanto, los datos obtenidos con este método de ensayo deben considerarse en el contexto de enfoques integrados, como los enfoques IATA, combinándolos con otra información complementaria, por ejemplo derivada de ensayos *in vitro* que aborden otros fenómenos clave de la AOP de la sensibilización cutánea, así como de métodos no experimentales, incluida la extrapolación a partir de análogos químicos.

El presente método de ensayo se puede utilizar en combinación con otra información complementaria, para apoyar la discriminación entre sensibilizantes cutáneos (es decir, categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas o del CLP) y no sensibilizantes en el contexto de un enfoque IATA. El presente método de ensayo no puede utilizarse por sí solo para clasificar sensibilizantes cutáneos en las subcategorías 1A y 1B definidas por el SGA de las Naciones Unidas o el CLP, ni para predecir la potencia de decisiones sobre evaluación de seguridad. Sin embargo, en función del marco normativo, un resultado positivo con el DPRA podrá utilizarse por sí solo para la clasificación de un producto en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas o del CLP.

Está comprobado que el método de ensayo DPRA es transferible a laboratorios con experiencia en los análisis con cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El nivel de reproducibilidad de las predicciones que cabe esperar del método de ensayo es del orden del 85 % dentro de un laboratorio y del 80 % entre laboratorios (10). Los resultados obtenidos en el estudio de validación (18) y en estudios publicados (19) en general indican que la exactitud del DPRA en cuanto a la discriminación de los sensibilizantes (es decir, cat. 1 del SGA de las Naciones Unidas o del CLP) y los no sensibilizantes es del 80 % (N=157) con una sensibilidad del 80 % (88/109) y una especificidad del 77 % (37/48) en comparación con los resultados del LLNA. Es más probable que el DPRA subestime los productos que muestran una potencia de sensibilización cutánea baja o moderada (es decir, subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas o del CLP) que los productos que presentan una potencia de sensibilización cutánea elevada (es decir, subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas o del CLP) (18) (19). Sin embargo, los valores de la exactitud aquí indicados para el DPRA utilizado como único método de ensayo solo son indicativos, ya que el método de ensayo debe considerarse en combinación con otras fuentes de información en el contexto de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones del punto 9 anterior. Además, a la hora de evaluar los métodos de ensayo de la sensibilización cutánea sin animales, debe tenerse en cuenta que el ensayo LLNA y otros ensayos con animales pueden no reflejar plenamente la situación en la especie de interés, es decir, los seres humanos. Sobre la base de los datos disponibles en general, se ha demostrado que el DPRA es aplicable a productos problema que abarcan una gran variedad de grupos funcionales orgánicos, mecanismos de reacción, potencias de sensibilización cutánea (determinada en estudios *in vivo*) y propiedades fisicoquímicas (8) (9) (10) (19). En conjunto, esta información indica la utilidad del DPRA para contribuir a la identificación del peligro de sensibilización cutánea.

▼M7

El término producto problema se utiliza en el presente método de ensayo para referirse a lo que se somete a ensayo y no está relacionado con la aplicabilidad del DPRA al ensayo de sustancias o mezclas. El presente método de ensayo no es aplicable a los compuestos metálicos, de los que se sabe que reaccionan con proteínas por mecanismos distintos de la unión covalente. El producto problema debe ser soluble en un disolvente adecuado a una concentración final de 100 mM (véase el punto 18). No obstante, los productos problema que no sean solubles a dicha concentración pueden someterse a ensayo a concentraciones solubles más bajas. En tal caso, un resultado positivo podría seguir utilizándose para apoyar la identificación del producto problema como sensibilizante cutáneo, pero de un resultado negativo no podría deducirse ninguna conclusión firme sobre la falta de reactividad. Se dispone actualmente de información limitada sobre la aplicabilidad del DPRA a las mezclas de composición conocida (18) (19). Sin embargo, se considera que el DPRA es técnicamente aplicable al ensayo de las sustancias con componentes múltiples y mezclas de composición conocida (véase el punto 18). Antes de la utilización de este método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines reglamentarios, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la reglamentación impone el ensayo de la mezcla. El actual modelo de predicción no puede utilizarse con mezclas complejas de composición desconocida o con sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos (es decir, sustancias UVCB) debido a la proporción molar definida del producto problema y del péptido. Con este fin, deberá desarrollarse un nuevo modelo de predicción basado en un enfoque gravimétrico. En los casos en que haya pruebas sobre la inaplicabilidad del método de ensayo a otras categorías específicas de productos, el método de ensayo no deberá utilizarse con tales categorías específicas de productos.

El presente método de ensayo es un método *in chemico* que no incluye ningún sistema metabólico. Los productos que requieren bioactivation enzimática para realizar su potencial de sensibilización cutánea (es decir, pro-haptenos) no pueden detectarse por este método de ensayo. Se señala que los productos que se hacen sensibilizantes después de una transformación abiótica (es decir, pre-haptenos) son detectados correctamente en algunos casos por este método de ensayo (18). En vista de lo anterior, los resultados obtenidos con el método de ensayo deben interpretarse en el contexto de las limitaciones señaladas y en relación con otras fuentes de información en el marco de un enfoque IATA. Los productos problema que no se unan covalentemente al péptido sino que fomenten su oxidación (es decir, la dimerización de la cisteína) podrían provocar una posible sobreestimación de la reducción del péptido, con el consiguiente riesgo de predicciones positivas falsas o de la adscripción a una clase de reactividad más elevada (véanse los puntos 29 y 30).

Tal como se describe, el DPRA apoya la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes. No obstante, podrá contribuir también a la evaluación de la potencia sensibilizante (11) cuando se utilice en enfoques integrados, como los enfoques IATA. Sin embargo, es necesario seguir trabajando, preferentemente a partir de datos humanos, para determinar de qué modo los resultados del DPRA pueden informar sobre la evaluación de la potencia.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El DPRA es un método *in chemico* que cuantifica la concentración restante de péptido que contiene cisteína o lisina tras 24 horas de incubación a 25 ± 2,5 °C con el producto problema. Los péptidos sintéticos contienen fenilalanina a fin de ayudar en la detección. La concentración relativa del péptido se mide mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con elución en gradiente y detección por UV a 220 nm. Los valores porcentuales de reducción del péptido con cisteína y lisina se calculan a continuación y se utilizan en un modelo de predicción (véase el punto 29) que permite asignar el producto problema a una de las cuatro clases de reactividad utilizadas para apoyar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes.

▼M7

Antes de proceder al uso sistemático del método descrito en el presente método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias recomendadas al efecto en el apéndice 2.

PROCEDIMIENTO

El presente método de ensayo se basa en el protocolo n.º 154 DB-ALM del DPRA (20), que representa el protocolo utilizado en el estudio de validación coordinado por el LRUE del CEVMA. Se recomienda que se siga este protocolo cuando se aplique y utilice el método en el laboratorio. A continuación se recoge una descripción de los principales componentes y procedimientos del DPRA. Si se utiliza una configuración alternativa de HPLC, debe demostrarse su equivalencia con la configuración validada descrita en el protocolo DB-ALM (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para la competencia que figuran en el apéndice 2).

**Preparación de los péptidos que contienen cisteína o lisina**

Las soluciones madre de péptidos sintéticos que contienen cisteína (Ac-RFAA-**C**AA-COOH) y lisina (Ac-RFAA**K**AA-COOH), de pureza superior al 85 % y preferiblemente en la gama de 90-95 %, deben prepararse justo antes de su incubación con el producto problema. La concentración final del péptido con cisteína debe ser de 0,667 mM en solución amortiguadora de fosfato de pH 7,5, mientras que la concentración final del péptido con lisina debe ser de 0,667 mM en solución amortiguadora de acetato de amonio de pH 10,2. La secuencia de tandas de HPLC debe establecerse de forma que se mantenga el tiempo de análisis con HPLC por debajo de 30 horas. Con la configuración de HPLC utilizada en el estudio de validación y descrita en este método de ensayo, pueden acogerse en una misma tanda de HPLC hasta 26 muestras analíticas (que incluyen el producto problema, el testigo positivo y el número adecuado de testigos de disolvente en función del número de disolventes distintos utilizados en el ensayo, cada uno ensayado por triplicado). Todas las réplicas analizadas en la misma tanda deben utilizar las misma soluciones madre de péptidos con cisteína y lisina. Se recomienda comprobar los diferentes lotes de péptidos antes de su utilización para garantizar que su solubilidad es adecuada.

**Preparación del producto problema**

La solubilidad del producto problema en un disolvente adecuado debe evaluarse antes de realizar el ensayo siguiendo el procedimiento de solubilización descrito en el protocolo DB-ALM del DPRA (20). Un disolvente adecuado debe disolver completamente el producto problema. Dado que en el DPRA se incuba con péptidos de cisteína o de lisina un gran exceso de producto problema, la inspección visual de la formación de una solución clara se considera suficiente para determinar que está disuelto el producto problema (y todos sus componentes en el caso de someter a ensayo una sustancia de componentes múltiples o una mezcla). Son disolventes adecuados el acetonitrilo, el agua, la mezcla 1:1 de agua y acetonitrilo, el isopropanol, la acetona o la mezcla 1:1 de acetona y acetonitrilo. Pueden utilizarse otros disolventes siempre y cuando no afecten a la estabilidad del péptido controlada con testigos de referencia C (es decir, muestras constituidas por el péptido solo, disuelto en el disolvente adecuado; véase el apéndice 3). Como última opción, si el producto problema no es soluble en ninguno de estos disolventes, se debe intentar solubilizarlo en 300 µl de DMSO y diluir la solución resultante con 2 700 µl de acetonitrilo y, si el producto problema no es soluble en esta mezcla, se debe intentar solubilizar la misma cantidad de producto problema en 1 500 µl de DMSO y diluir la solución resultante con 1 500 µl de acetonitrilo. El producto problema debe pesarse previamente en frascos de vidrio y disolverse inmediatamente antes del ensayo en un disolvente apropiado a fin de preparar una solución 100 mM. Con las mezclas y las sustancias de componentes múltiples de composición conocida, deben determinarse una única pureza, sumando la proporción de sus componentes (excepto el agua), y un único peso molecular aparente, considerando los distintos pesos moleculares de cada componente de la mezcla (excepto el agua) y sus respectivas proporciones. La pureza y el peso molecular aparente resultantes deben utilizarse a continuación en el cálculo del peso de producto problema necesario para preparar una solución 100 mM. En el caso de los polímeros de

▼M7

los que no pueda determinarse un peso molecular predominante, podría considerarse el peso molecular del monómero (o el peso molecular aparente de los distintos monómeros que constituyen el polímero) para preparar una solución 100 mM. Sin embargo, cuando se someten a ensayo mezclas, sustancias de componentes múltiples o polímeros de composición conocida, debe considerarse la posibilidad de someter a ensayo también el producto puro. En el caso de los líquidos, el producto puro debe someterse a ensayo tal cual, sin dilución previa, incubándolo a las proporciones molares de 1:10 y 1:50 con los péptidos de cisteína y lisina, respectivamente. En el caso de los sólidos, el producto problema se debe disolver a la máxima concentración soluble en el mismo disolvente utilizado para preparar la solución de concentración aparente 100 mM. Debe entonces someterse a ensayo tal cual, sin diluir más, incubándolo a las proporciones molares de 1:10 y 1:50 con los péptidos de cisteína y lisina, respectivamente. Unos resultados concordantes (reactivos o no reactivos) entre la solución de concentración aparente 100 mM y el producto puro deben permitir la deducción de una conclusión firme sobre el resultado.

**Preparación del testigo positivo, de los testigos de referencia y de los testigos de coelución**

El aldehído cinámico (CAS 104-55-2; ≥ 95 % de pureza de grado alimentario) debe utilizarse como testigo positivo (TP) a una concentración de 100 mM en acetonitrilo. Pueden utilizarse otros testigos positivos adecuados que den preferentemente valores de reducción en la gama media, si se dispone de datos históricos para obtener criterios de aceptación de tandas comparables. Por otra parte, también han de incluirse testigos de referencia (es decir, muestras que contengan únicamente el péptido disuelto en el disolvente adecuado) en la secuencia de tandas de HPLC y se utilizan para comprobar la idoneidad del sistema de HPLC antes del análisis (testigos de referencia A), la estabilidad de los testigos de referencia a lo largo del tiempo (testigos de referencia B) y que el disolvente utilizado para disolver el producto problema no afecta a la reducción porcentual del péptido (testigos de referencia C) (véase el apéndice 3). El testigo de referencia apropiado para cada producto se utiliza para calcular la reducción porcentual del péptido correspondiente a ese producto (véase el punto 26). Además, respecto a cada uno de los productos problema analizados, debe incluirse en la secuencia de tandas un testigo de coelución constituido por el producto problema solo, a fin de detectar la posible coelución del producto problema con el péptido de lisina o de cisteína.

**Incubación del producto problema con las soluciones del péptido de lisina y de cisteína**

Las soluciones del péptido de cisteína y de lisina deben incubarse en frascos de vidrio del automuestreador con el producto problema a las proporciones de 1:10 y 1:50 respectivamente. Si se observa un precipitado inmediatamente después de la adición de la solución del producto problema a la solución de péptido, debido a la baja hidrosolubilidad del producto problema, no se puede estar seguro de qué proporción del producto problema permanece en la solución para reaccionar con el péptido. Por consiguiente, en ese caso, un resultado positivo puede ser útil todavía, pero un resultado negativo es incierto y debe interpretarse con la debida diligencia (véase también lo dispuesto en el punto 11 sobre el ensayo de productos insolubles hasta una concentración de 100 mM). La solución de reacción debe quedarse en la oscuridad y a 25 ± 2,5 °C durante 24 ± 2 horas antes del análisis con HPLC. Cada producto problema debe analizarse por triplicado con ambos péptidos. Se inspeccionarán visualmente unas muestras antes del análisis con HPLC. Si se observa precipitado o separación de fases, pueden centrifugarse las muestras a baja velocidad (100-400 x g) para llevar el precipitado hasta el fondo del frasco como precaución, ya que la presencia de grandes cantidades de precipitado puede obstruir los tubos o columnas de HPLC. Si se observa precipitación o separación de fases tras el período de incubación, es posible subestimar la reducción del péptido, por lo que en caso de resultado negativo no puede extraerse con la confianza suficiente ninguna conclusión sobre la falta de reactividad.

▼M7

**Preparación de la curva patrón de calibración de HPLC**

Debe obtenerse una curva patrón de calibración para los péptidos, tanto para el de cisteína como para el de lisina. Deben prepararse patrones de los péptidos en una solución del 20 % o 25 % de acetonitrilo:solución amortiguadora, utilizando solución amortiguadora de fosfato (pH 7,5) para el péptido de cisteína y solución amortiguadora de acetato de amonio (pH 10,2) para el péptido de lisina. Utilizando diluciones en serie de la solución madre de péptido (0,667 mM), deben prepararse seis soluciones de calibración para cubrir la gama de 0,534 a 0,0167 mM. Debe incluirse también en la curva patrón de calibración un blanco de la solución amortiguadora de dilución. Las curvas de calibración adecuadas deben tener un valor $r^2 > 0,99$.

**Preparación de la HPLC y análisis**

La idoneidad del sistema de HPLC debe verificarse antes de efectuar el análisis. La reducción de los péptidos se determina mediante HPLC combinada con un detector de UV (detector por red de fotodiodos o detector de absorbancia de longitud de onda fija con señal de 220 nm). La columna correspondiente se instala en el sistema de HPLC. La configuración de HPLC descrita en el protocolo validado utiliza como columna preferida una Zorbax SB-C-18 de 2,1 mm × 100 mm × 3,5 micras. Con esta columna de HPLC de fase inversa, todo el sistema debe equilibrarse a 30 °C con un 50 % de fase A (0,1 % (v/v) de ácido trifluoroacético en agua) y un 50 % de fase B (0,085 % (v/v) de ácido trifluoroacético en acetonitrilo) durante al menos 2 horas antes de pasar la tanda. El análisis con HPLC debe efectuarse utilizando un caudal de 0,35 ml/min y un gradiente lineal del 10 % al 25 % de acetonitrilo durante 10 minutos, seguido de un rápido incremento hasta el 90 % de acetonitrilo para eliminar otros materiales. Deben inyectarse volúmenes iguales de cada patrón, muestra y testigo. La columna debe volver a equilibrarse entre inyecciones en las condiciones iniciales durante 7 minutos. Si se utiliza una columna de HPLC de fase inversa diferente, puede ser necesario ajustar los parámetros de configuración descritos anteriormente, para garantizar la adecuada elución e integración de los péptidos de cisteína y lisina, incluido el volumen de inyección, que podrá variar en función del sistema utilizado (normalmente en la banda de 3-10 µl). Si se utiliza una configuración alternativa de HPLC, es importante demostrar su equivalencia con la configuración validada descrita anteriormente (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para la competencia que figuran en el apéndice 2). La absorbancia se mide a 220 nm. En caso de que se utilice un detector por red de fotodiodos, debe registrarse también la absorbancia a 258 nm. Debe señalarse que algunos lotes de acetonitrilo pueden tener un impacto negativo en la estabilidad de los péptidos, y esto ha de evaluarse cuando se utilice un nuevo lote de acetonitrilo. La relación entre el área del pico 220 y el área del pico 258 puede utilizarse como indicador de coelución. Respecto a cada muestra, una relación en la banda de 90 % < relación media ([1]) de las áreas de las muestras testigo <100 % puede constituir una buena indicación de que no ha habido coelución.

Puede haber productos problema que favorezcan la oxidación del péptido de cisteína. El pico del péptido de cisteína dimerizado puede ser objeto de seguimiento visual. En los casos en que resulte que se ha producido dimerización, esto debe indicarse, ya que es posible sobrestimar la reducción porcentual del péptido, lo que llevaría a falsas predicciones positivas o a la asignación a una clase de reactividad más elevada (véanse los puntos 29 y 30).

El análisis con HPLC de los péptidos de cisteína y de lisina puede realizarse simultáneamente (si se dispone de dos sistemas de HPLC) o en días distintos. Si el análisis se realiza en días distintos, todas las soluciones del producto problema deben prepararse de nuevo para los dos ensayos cada día. El análisis debe programarse para garantizar que la inyección de la primera muestra comienza entre 22 y 26 horas después de la mezcla del producto problema con la solución de péptido. La secuencia de tandas de HPLC debe establecerse de forma que se

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

mantenga el tiempo de análisis con HPLC por debajo de 30 horas. Con la configuración de HPLC utilizada en el estudio de validación y descrita en este método de ensayo, pueden analizarse hasta 26 muestras en una sola tanda de HPLC (véase también el punto 17). En el apéndice 3 se encuentra un ejemplo de secuencia de análisis con HPLC.

DATOS E INFORME

**Evaluación de los datos**

La concentración de péptido de cisteína o de lisina se determina por fotometría a 220 nm en cada muestra midiendo el área del pico (área bajo la curva, AUC) de los picos adecuados y se calcula la concentración de péptido utilizando la curva de calibración lineal obtenida con los patrones.

La reducción porcentual de los péptidos en cada muestra se determina midiendo el área del pico y dividiéndola por la media del área del pico de los testigos de referencia C pertinentes (véase el apéndice 3), con arreglo a la fórmula descrita a continuación.

$$Reducción\ porc.péptidos = \left[1 - \left(\frac{Área\ pico\ péptidos\ inyección\ réplica}{Media\ área\ pico\ en\ testigos\ de\ referencia\ C}\right)\right] \times 100$$

**Criterios de aceptación**

Para que una tanda se considere válida, deben cumplirse los siguientes criterios:

a) las curvas patrón de calibración deben tener un valor $r^2 > 0{,}99$.

b) el valor medio de la reducción porcentual de los péptidos de las tres réplicas del testigo positivo con aldehído cinámico debe situarse entre el 60,8 % y el 100 % en el caso del péptido de cisteína, y entre el 40,2 % y el 69,0 % en el del péptido de lisina, y la desviación típica máxima (SD) de las réplicas del testigo positivo debe ser < 14,9 % para la reducción porcentual de cisteína y < 11,6 % para la reducción porcentual de lisina, y

c) la concentración media de péptido en los testigos de referencia A debe ser de 0,50 ± 0,05 mM, y el coeficiente de variación (CV) de las áreas de los picos de los péptidos en los nueve testigos de referencia B y C en acetonitrilo debe ser < 15,0 %.

En caso de que no se cumpla uno o varios de estos criterios, la tanda debe repetirse.

Para que los resultados de un producto problema se consideren válidos, deben cumplirse los siguientes criterios:

a) la desviación típica máxima de las réplicas del producto problema debe ser < 14,9 % para la reducción porcentual de cisteína y < 11,6 % para la reducción porcentual de lisina,

b) la media de la concentración de péptidos de los tres testigos de referencia C en el disolvente adecuado debe ser 0,50 ± 0,05 mM. Si no se cumplen estos criterios, los datos deberán descartarse y la tanda repetirse con ese producto problema concreto.

**Modelo de predicción**

Se calcula la reducción porcentual media de cisteína y de lisina para cada producto problema. Una reducción negativa se considera «0» al calcular la media. Utilizando el modelo de predicción cisteína 1:10/lisina 1:50 que se muestra en el cuadro 1, ha de aplicarse el umbral del 6,38 % de reducción media de los péptidos para apoyar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes en el marco de un enfoque IATA. La aplicación del modelo de predicción para asignar un producto problema a una clase de reactividad (es decir, reactividad baja, moderada y elevada) puede quizás resultar útil para informar sobre la evaluación de la potencia en el marco de un enfoque IATA.

▼M7

*Cuadro 1:*

**Modelo de predicción** [1] **cisteína 1:10/lisina 1:50**

| Media de la reducción porcentual de cisteína y lisina | Clase de reactividad | Predicción del DPRA [2] |
|---|---|---|
| 0 % ≤ reducción porcentual media ≤ 6,38 % | Reactividad nula o mínima | Negativa |
| 6,38 % < reducción porcentual media ≤ 22,62 % | Reactividad baja | Positiva |
| 22,62 % < reducción porcentual media ≤ 42,47 % | Reactividad moderada | |
| 42,47 % < reducción porcentual media ≤ 100 % | Reactividad elevada | |

[1] Los números se refieren a valores umbral obtenidos estadísticamente y no están ligados a la precisión de la medición.
[2] Las predicciones del DPRA deben tenerse en cuenta en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 9 y 12.

Puede haber casos en los que el producto problema (la sustancia o uno o varios de los componentes de una sustancia de componentes múltiples o de una mezcla) absorba significativamente a 220 nm y tenga el mismo tiempo de retención que el péptido (coelución). La coelución puede resolverse ajustando ligeramente la configuración de la HPLC para separar más el tiempo de elución del producto problema y el del péptido. Si se utiliza una configuración alternativa de HPLC para resolver la coelución, se debe demostrar su equivalencia con la configuración validada (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para la competencia que figuran en el apéndice 2). Cuando se produce coelución, no puede integrarse el pico del péptido y resulta imposible calcular la reducción porcentual del péptido. Si se produce coelución de tales productos problema tanto con el péptido de cisteína como con el de lisina, el análisis debe considerarse «no concluyente». En los casos en que solo se produce coelución con el péptido de lisina, puede utilizarse el modelo de predicción cisteína 1:10 indicado en el cuadro 2.

*Cuadro 2:*

**Modelo de predicción** [1] **cisteína 1:10**

| Reducción porcentual de cisteína (cis) | Clase de reactividad | Predicción del DPRA [2] |
|---|---|---|
| 0 % ≤ reducción porcentual de cis ≤ 13,89 % | Reactividad nula o mínima | Negativa |
| 13,89 % reducción porcentual de cis ≤ 23,09 % | Reactividad baja | Positiva |
| 23,09 % reducción porcentual de cis ≤ 98,24 % | Reactividad moderada | |
| 98,24 % reducción porcentual de cis ≤ 100 % | Reactividad elevada | |

[1] Los números se refieren a valores umbral obtenidos estadísticamente y no están ligados a la precisión de la medición.
[2] Las predicciones del DPRA deben tenerse en cuenta en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 9 y 12.

Es posible que haya otros casos en los que sea incompleto el solapamiento entre el tiempo de retención del producto problema y el de alguno de los péptidos. En tales casos, pueden calcularse los valores de reducción porcentual de los péptidos, y se pueden utilizar en el modelo de predicción cisteína 1:10/lisina 1:50; sin embargo, la asignación del producto problema a una clase de reactividad no puede efectuarse con exactitud.

▼M7

Debe ser suficiente un único análisis de un producto problema con HPLC tanto para el péptido de cisteína como para el de lisina, si el resultado es inequívoco. Sin embargo, en casos de resultados próximos al umbral utilizado para discriminar entre resultados positivos y negativos (es decir, resultados límite), puede ser necesario efectuar más ensayos. En las situaciones en las que la reducción porcentual media está comprendida en el intervalo del 3 % al 10 % con el modelo de predicción cisteína 1:10/lisina 1:50 o la reducción porcentual de cisteína está comprendida en el intervalo del 9 % al 17 % con el modelo de predicción cisteína 1:10, debe considerarse la conveniencia de efectuar una segunda tanda, así como una tercera en caso de resultados discordantes entre las dos primeras.

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema*

— Sustancia con un solo componente

  — Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

  — Aspecto físico, hidrosolubilidad, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

  — Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

  — Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

  — Concentración o concentraciones estudiadas;

  — Condiciones de almacenamiento y estabilidad en la medida de lo posible.

— Sustancia de componentes múltiples, sustancia UVCB y mezcla:

  — Caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), en la medida de lo posible;

  — Aspecto físico, hidrosolubilidad, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

  — Peso molecular o peso molecular aparente en el caso de mezclas/polímeros de composición conocida u otra información pertinente para la realización del estudio;

  — Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

  — Concentración o concentraciones estudiadas;

  — Condiciones de almacenamiento y estabilidad en la medida de lo posible.

*Testigos*

— Testigo positivo

  — Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

  — Aspecto físico, hidrosolubilidad, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

  — Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

▼**M7**

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de almacenamiento y estabilidad en la medida de lo posible;

— Referencia a los resultados de los testigos positivos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación de las tandas, si procede.

— Disolvente o vehículo

— Disolvente/vehículo utilizado y proporción de sus componentes, si procede;

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, y/u otros identificadores;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Aspecto físico, peso molecular, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales en el caso de que se utilicen disolventes/vehículos distintos de los especificados en el método de ensayo y en la medida de lo posible;

— Condiciones de almacenamiento y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente para cada producto problema;

— Respecto al acetonitrilo, resultados del ensayo de impacto en la estabilidad de los péptidos.

*Preparación de los péptidos, testigo positivo y producto problema*

— Caracterización de las soluciones de péptidos (proveedor, lote, peso exacto del péptido, volumen añadido para la solución madre);

— Caracterización de la solución de testigo positivo (peso exacto de sustancia de testigo positivo, volumen añadido para la solución problema);

— Caracterización de las soluciones de producto problema (peso exacto de producto problema, volumen añadido para la solución problema).

*Ajustes instrumentales de la HPLC y análisis*

— Tipo de instrumento de HPLC, columna de HPLC y precolumna, detector, automuestreador;

— Parámetros pertinentes para el análisis con HPLC, como la temperatura de la columna, volúmenes de inyección, caudal y gradiente.

*Idoneidad del sistema*

— Área del pico del péptido a 220 nm de cada réplica de patrón y de testigo de referencia A;

— Curva de calibración lineal representada gráficamente y valor de $r^2$ notificado;

— Concentración de péptidos de cada réplica de los testigos de referencia A;

— Concentración media de péptidos (mM) de los tres testigos de referencia A, SD y CV;

— Concentración de péptidos de los testigos de referencia A y C.

▼**M7**

*Secuencia de análisis*

— Respecto a los testigos de referencia:

  — Área del pico del péptido a 220 nm de cada réplica de B y C;

  — Área media del pico del péptido a 220 nm de los nueve testigos de referencia B y C en acetonitrilo, SD y CV (para la estabilidad de los testigos de referencia a lo largo del tiempo del análisis);

  — Respecto a cada disolvente utilizado, área media del pico del péptido a 220 nm de los tres testigos de referencia C adecuados (para el cálculo de la reducción porcentual de los péptidos);

  — Respecto a cada disolvente utilizado, concentración de péptido (mM) en los tres testigos de referencia C adecuados;

  — Respecto a cada disolvente utilizado, concentración media de péptido (mM) en los tres testigos de referencia C, SD y CV adecuados.

— Respecto al testigo positivo:

  — Área del pico del péptido a 220 nm de cada réplica;

  — Reducción porcentual del péptido de cada réplica;

  — Reducción porcentual media del péptido de las tres réplicas, SD y CV.

— Respecto a cada producto problema:

  — Aparición de precipitado en la mezcla de reacción al final del período de incubación, si se ha observado; si el precipitado se centrifuga o se vuelve a solubilizar;

  — Presencia de coelución;

  — Descripción de cualesquiera otras observaciones pertinentes, si procede;

  — Área del pico del péptido a 220 nm de cada réplica;

  — Reducción porcentual del péptido de cada réplica;

  — Reducción porcentual media del péptido de las tres réplicas, SD y CV;

  — Valores de reducción porcentual media de cisteína y de lisina;

  — Modelo de predicción utilizado y predicción del DPRA.

*Ensayos de competencia*

— En su caso, procedimiento utilizado para demostrar la competencia del laboratorio en cuanto a la utilización del método de ensayo (por ejemplo, mediante el ensayo de sustancias para la competencia) o para demostrar que el método de ensayo proporciona resultados reproducibles a lo largo del tiempo.

*Discusión de los resultados*

— Discusión de los resultados obtenidos con el método de ensayo DPRA;

— Discusión de los resultados obtenidos con el método de ensayo en el contexto de un enfoque IATA si se dispone de otra información pertinente.

*Conclusión*

▼M7

BIBLIOGRAFÍA

(1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2013. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html

(2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168, OECD, Paris.

(3) Capítulo B.6 del presente anexo, Sensibilización de la piel.

(4) Capítulo B.42 del presente anexo, Ensayo con ganglios linfáticos locales.

(5) Capítulo B.50 del presente anexo, Sensibilización cutánea: ensayo con ganglios linfáticos locales: DA.

(6) Capítulo B.51 del presente anexo, Sensibilización cutánea: ensayo con ganglios linfáticos locales: BrdU-ELISA.

(7) Adler *et al.* (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85:367-485.

(8) Gerberick *et al.* (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. Toxicological Sciences 81:332-343.

(9) Gerberick *et al.* (2007). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. Toxicological Sciences 97:417-427.

(10) LRUE del CEVMA (2013). Recommendation on the Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) for skin sensitisation testing. Disponible en: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

(11) Jaworska *et al.* (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. Journal of Applied Toxicology, published online, 14 May 2013, DOI: 10.1002/jat.2869.

(12) Bauch *et al*. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potential. Regulatory Toxicology and Pharmacology 63: 489-504.

(13) Nukada *et al.* (2013). Data integration of non-animal tests for the development of a test battery to predict the skin sensitizing potential and potency of chemicals. Toxicology *in vitro* 27:609 618.

(14) Ball *et al* (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regulatory Toxicology and Pharmacology 60:389-400.

(15) Landsteiner and Jacobs (1936). Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. Journal of Experimental Medicine 64:625-639.

(16) Dupuis and Benezra (1982). Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York & Basel: Marcel Dekker Inc.

(17) Lepoittevin *et al.* (1998). Allergic contact dermatitis: the molecular basis. Springer, Berlin.

(18) LRUE del CEVMA (2012). Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) Validation Study Report 74pp. Accessible at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-direct-peptide-reactivity-assay-dpra

▼**M7**

(19) Natsch *et al.* (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, published online, 9 April 2013, DOI:10.1002/jat.2868.

(20) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 154: Direct Peptide Reactivity assay (DPRA) for skin sensitisation testing 17pp. Accessible at: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

(21) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment, No. 34. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

(22) FDA (Food and Drug Administration (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 22pp. Accessible at: www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm070107.pdf — 138

(23) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su «pertinencia». Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (21).

**Ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*)**: Secuencia de fenómenos desde la estructura química de un producto o grupo de productos similares diana, pasando por el fenómeno molecular desencadenante, hasta un resultado *in vivo* de interés (2).

**Curva de calibración**: Relación entre el valor de la respuesta experimental y la concentración analítica (también denominada *curva patrón*) de una sustancia conocida.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Coeficiente de variación**: Medida de la variabilidad que se calcula para un grupo de datos replicados dividiendo la desviación típica por la media. Puede multiplicarse por 100 para expresarlo como porcentaje.

**Peligro**: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**Enfoque integrado de pruebas y evaluación (IATA, *Integrated Approach to Testing and Assessment*)**: Enfoque estructurado para la identificación del peligro (potencial), caracterización del peligro (potencia) o evaluación de la seguridad (potencial/potencia y exposición) de un producto o grupo de productos, que integra y pondera de forma estratégica todos los datos pertinentes para fundamentar una decisión reglamentaria relativa a posibles peligros o riesgos o a la necesidad de realizar ensayos más específicos y, por tanto, mínimos.

**Fenómeno molecular desencadenante**: Perturbación de un sistema biológico inducida por un producto a nivel molecular y caracterizada como el fenómeno inicial de la ruta de resultados adversos.

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta por dos o más sustancias que no reaccionan en ella (1).

**Sustancia con un solo componente**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**Sustancia de componentes múltiples**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración $\geq$ 10 % (p/p) y $<$ 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química, mientras que una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

**Testigo positivo**: Réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Testigo de referencia**: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, incluido el disolvente o vehículo, y que se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con el producto problema y otras muestras testigo a fin de determinar la respuesta de base correspondiente a las

▼M7

muestras tratadas con el producto problema disuelto en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un testigo negativo en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Pertinencia**: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (21).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (21).

**Reproducibilidad**: Coincidencia entre los resultados obtenidos en el ensayo del mismo producto utilizando el mismo protocolo de ensayo (véase «Fiabilidad») (21).

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (21).

**Especificidad**: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (21).

**Sustancia**: Elementos químicos y sus compuestos en estado natural u obtenidos mediante cualquier proceso de producción, incluidos los aditivos necesarios para mantener la estabilidad del producto y las eventuales impurezas derivadas del proceso empleado, pero excluidos los disolventes que se puedan separar sin influir en la estabilidad de la sustancia ni cambiar su composición (1).

**Idoneidad del sistema**: Determinación del comportamiento de un instrumento (por ejemplo, sensibilidad) mediante el análisis de un patrón de referencia antes de aplicarlo al lote analítico (22).

**Producto problema**: El término «producto problema» se utiliza para hacer referencia a lo que se somete a ensayo.

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de la ONU)**: Sistema que propone la clasificación de productos químicos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros fisicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos.

**Método de ensayo válido**: Método de ensayo del que se considera que tiene suficiente pertinencia y fiabilidad con un fin específico y que se basa en principios sólidos desde el punto de vista científico. Un método de ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado (21).

▼M7

*Apéndice 2*

**SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA**

**Sensibilización cutánea *in chemico*: Ensayo directo de reactividad peptídica**

Antes de proceder al uso sistemático de este método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta obtención de la predicción del DPRA prevista respecto a las diez sustancias recomendadas al efecto en el cuadro 1, y la obtención de valores de reducción de cisteína y lisina que estén dentro de la gama de referencia con ocho de las diez sustancias utilizadas para demostrar la competencia en relación con cada péptido. Estas sustancias para la competencia se han seleccionado a fin de representar la gama de respuestas de los peligros de sensibilización cutánea. Otros criterios de selección son su disponibilidad comercial, la disponibilidad de datos de referencia *in vivo* de alta calidad y de datos de alta calidad obtenidos *in vitro* con el DPRA, y que se hayan utilizado en el estudio de validación coordinado por el LRUE del CEVMA para demostrar el éxito de la aplicación del método de ensayo en los laboratorios participantes.

*Cuadro 1:*

**Sustancias recomendadas para demostrar la competencia técnica respecto al ensayo directo de reactividad peptídica**

| Sustancias para la competencia | CAS RN | Estado físico | Predicción *in vivo* (1) | Predicción del DPRA (2) | Intervalo (3) de reducción porcentual del péptido de cisteína | Intervalo (3) de reducción porcentual del péptido de lisina |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,4-Dinitroclorobenceno | 97-00-7 | Sólido | Sensibilizante (extremo) | Positiva | 90-100 | 15-45 |
| Oxazolona | 15646-46-5 | Sólido | Sensibilizante (extremo) | Positiva | 60-80 | 10-55 |
| Formaldehído | 50-00-0 | Líquido | Sensibilizante (fuerte) | Positiva | 30-60 | 0-24 |
| Bencilidenacetona | 122-57-6 | Sólido | Sensibilizante (moderado) | Positiva | 80-100 | 0-7 |
| Farnesal | 19317-11-4 | Líquido | Sensibilizante (débil) | Positiva | 15-55 | 0-25 |
| 2,3-Butanodiona | 431-03-8 | Líquido | Sensibilizante (débil) | Positiva | 60-100 | 10-45 |
| 1-Butanol | 71-36-3 | Líquido | No sensibilizante | Negativa | 0-7 | 0-5,5 |
| 6- Metilcumarina | 92-48-8 | Sólido | No sensibilizante | Negativa | 0-7 | 0-5,5 |
| Ácido láctico | 50-21-5 | Líquido | No sensibilizante | Negativa | 0-7 | 0-5,5 |
| 4-Metoxiacetofenona | 100-06-1 | Sólido | No sensibilizante | Negativa | 0-7 | 0-5,5 |

(1) Las predicciones de peligro *in vivo* y de (potencia) se basan en datos de LLNA (19). La potencia *in vivo* se obtiene con los criterios propuestos por ECETOC (23).

(2) Las predicciones del DPRA deben tenerse en cuenta en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 9 y 11.

(3) Intervalos determinados sobre la base de al menos diez valores de reducción obtenidos por seis laboratorios independientes.

▼M7

*Apéndice 3*

**EJEMPLOS DE SECUENCIA DE ANÁLISIS**

| | |
|---|---|
| **Patrones de calibración y testigos de referencia** | STD1<br>STD2<br>STD3<br>STD4<br>STD5<br>STD6<br>Amortiguador de dilución<br>Testigo de referencia A, rep 1<br>Testigo de referencia A, rep 2<br>Testigo de referencia A, rep 3 |
| **Testigos de coelución** | Testigo de coelución 1 para el producto problema 1<br>Testigo de coelución 2 para el producto problema 2 |
| **Testigos de referencia** | Testigo de referencia B, rép. 1<br>Testigo de referencia B, rép. 2<br>Testigo de referencia B, rép. 3 |
| **Primera serie de réplicas** | Testigo de referencia C, rép. 1<br>Aldehído cinámico, rép. 1<br>Muestra 1, rép. 1<br>Muestra 2, rép. 1 |
| **Segunda serie de réplicas** | Testigo de referencia C, rép. 2<br>Aldehído cinámico, rép. 2<br>Muestra 1, rép. 2<br>Muestra 2, rép. 2 |
| **Tercera serie de réplicas** | Testigo de referencia C, rép. 3<br>Aldehído cinámico, rép. 3<br>Muestra 1, rép. 3<br>Muestra 2, rép. 3 |
| **Testigos de referencia** | Testigo de referencia B, rép. 4<br>Testigo de referencia B, rép. 5<br>Testigo de referencia B, rép. 6 |

Deben incluirse en la secuencia de análisis tres series de testigos de referencia (es decir, muestras constituidas únicamente por el péptido disuelto en el disolvente adecuado):
Testigo de referencia A: utilizado para comprobar la idoneidad del sistema de HPLC.
Testigo de referencia B: incluido al principio y al final de la secuencia de análisis para comprobar la estabilidad de los testigos de referencia a lo largo del tiempo de análisis.
Testigo de referencia C: incluido en la secuencia de análisis a fin de verificar que el disolvente utilizado para disolver el producto problema no afecta a la reducción porcentual del péptido.

▼M7

## B.60. SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: MÉTODO DE ENSAYO DE LA LUCIFERASA ARE-NRF2

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 442D (2015). Un sensibilizante cutáneo es una sustancia que induce una respuesta alérgica por contacto con la piel, tal como se define en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de la ONU) (1) y en el Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea (UE) ([1]). El presente método de ensayo proporciona un procedimiento *in vitro* (ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2) utilizado para apoyar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes de conformidad con el SGA de la ONU (1) y el CLP.

Existe un acuerdo general sobre los principales fenómenos biológicos subyacentes a la sensibilización cutánea. Los actuales conocimientos acerca de los mecanismos biológicos y químicos asociados con la sensibilización cutánea se han resumido en forma de una ruta de resultados adversos (*Adverse Outcome Pathway*, AOP) (2), que va desde el fenómeno molecular desencadenante, pasando por los fenómenos intermedios, hasta el efecto adverso para la salud, es decir la dermatitis alérgica de contacto en seres humanos o la hipersensibilidad de contacto en roedores (2) (3). El fenómeno molecular desencadenante es la unión covalente de sustancias electrofílicas a los centros nucleofílicos de las proteínas de la piel. El segundo fenómeno clave en esta AOP tiene lugar en los queratinocitos e incluye las respuestas inflamatorias, así como la expresión génica relacionada con rutas específicas de comunicación celular, tales como las rutas dependientes del elemento de respuesta antioxidante/electrófilo (ARE, *antioxidant/electrophile response element*). El tercer fenómeno clave es la activación de las células dendríticas, normalmente evaluada por la expresión de marcadores específicos de la superficie celular, quimiocinas y citocinas. El cuarto fenómeno clave es la proliferación de linfocitos T, que se evalúa indirectamente en el ensayo con ganglios linfáticos locales de múridos (4).

Tradicionalmente, la evaluación de la sensibilización cutánea se hacía con animales de laboratorio. Los métodos clásicos con cobayas, como el ensayo de maximización con cobayas de Magnusson y Kligman (GMPT) y el ensayo de Buehler [método B.6 (5)], estudian tanto la fase de inducción como la de desencadenamiento de la sensibilización cutánea. Un ensayo con múridos, el ensayo con ganglios linfáticos locales [LLNA, método B.42 (4)], y sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: DA [método B.50 (6)] y el LLNA: BrdU-ELISA [método B.51 (7)], que evalúan exclusivamente la respuesta de inducción, también han conseguido aceptación porque, sobre los ensayos con cobayas, tienen ventaja en relación tanto con el bienestar de los animales como con la medición objetiva de la fase de inducción de la sensibilización cutánea.

Más recientemente, algunos métodos farmacodinámicos *in chemico* e *in vitro* se han considerado científicamente válidos para la evaluación del peligro de sensibilización cutánea que representan los productos. Sin embargo, será necesario recurrir a combinaciones de métodos alternativos sin animales (*in silico, in chemico, in vitro*) dentro de un enfoque integrado de pruebas y evaluación (IATA) para poder sustituir por completo los ensayos con animales que se utilizan en la actualidad, habida cuenta de la limitada cobertura en cuanto a los mecanismos de la AOP de cada uno de los métodos de ensayo actualmente disponibles sin animales (2) (3).

Se propone el presente método de ensayo (ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2) para abordar el segundo fenómeno clave, como se explica en el punto 2. Se ha notificado que los sensibilizantes cutáneos inducen genes que están regulados por el elemento de respuesta antioxidante (ARE) (8) (9). Las pequeñas sustancias

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M7

electrofílicas tales como los sensibilizantes cutáneos pueden actuar sobre la proteína sensora Keap1 (proteína 1 asociada a ECH y de tipo Kelch) mediante, por ejemplo, la modificación covalente de su residuo de cisteína, lo que da lugar a que se disocie del factor de transcripción Nrf2 (factor nuclear 2 relacionado con el factor eritroide-2). El Nrf2 disociado puede entonces activar genes dependientes del ARE, como los genes que codifican las enzimas de destoxificación de fase II (8) (10) (11).

En la actualidad, el único ensayo de la luciferasa ARE-Nrf 2 *in vitro* correspondiente al presente método de ensayo es el ensayo KeratinoSens™ para el cual se han completado estudios de validación (9) (12) (13), seguidos de una revisión independiente *inter pares* dirigida por el laboratorio de referencia de la Unión Europea para las alternativas a los ensayos con animales (LRUE del CEVMA) (14). El ensayo KeratinoSens™ fue considerado científicamente válido para utilizarse como parte de un enfoque IATA, en apoyo de la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes con fines de clasificación de peligro y etiquetado (14). Los laboratorios que deseen aplicar el método de ensayo pueden obtener la línea celular recombinante utilizada en el ensayo KeratinoSens™ estableciendo un acuerdo de licencia con el creador del método de ensayo (15).

En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

CONSIDERACIONES INICIALES, APLICABILIDAD Y LIMITACIONES

Dado que la activación de la ruta Keap1-Nrf2-ARE aborda únicamente el segundo fenómeno clave de la AOP de la sensibilización cutánea, resulta poco probable que la información obtenida con los métodos de ensayo basados en la activación de esta ruta sea suficiente por sí sola para permitir una conclusión sobre el potencial de sensibilización cutánea de los productos. Por lo tanto, los datos obtenidos con el presente método de ensayo deben considerarse en el contexto de enfoques integrados, como los enfoques IATA, combinándolos con otra información complementaria, por ejemplo derivada de ensayos *in vitro* que aborden otros fenómenos clave de la AOP de la sensibilización cutánea, así como de métodos no experimentales, incluida la extrapolación a partir de análogos químicos. En la bibliografía se recogen ejemplos del uso del método de la luciferasa ARE-Nrf2 en combinación con otra información (13) (16) (17) (18) (19).

El presente método de ensayo se puede utilizar para apoyar la discriminación entre sensibilizantes cutáneos (es decir, categoría 1 del SGA de la ONU o del CLP) y no sensibilizantes en el contexto de un enfoque IATA. El presente método de ensayo no puede utilizarse por sí solo para subcategorizar los sensibilizantes cutáneos en las subcategorías 1A y 1B definidas por el SGA de la ONU o el CLP, ni para predecir la potencia de las decisiones sobre la evaluación de la seguridad. Sin embargo, en función del marco normativo, un resultado positivo podrá utilizarse por sí solo para la clasificación de un producto en la categoría 1 del SGA de la ONU o del CLP.

Sobre la base del conjunto de datos obtenidos del estudio de validación y de ensayos internos utilizados para la revisión *inter pares* independiente del método de ensayo, el ensayo KeratinoSens™ resultó ser transferible a laboratorios con experiencia en cultivo celular. El nivel de reproducibilidad de las predicciones que cabe esperar del método de ensayo es del orden del 85 % dentro de un laboratorio y entre laboratorios (14). La exactitud (77 % — 155/201), la sensibilidad (78 % — 71/91) y la especificidad (76 % — 84/110) del ensayo KeratinoSens™ para discriminar los sensibilizantes cutáneos (es decir, Cat. 1 del SGA de la ONU o del CLP) de los no sensibilizantes en comparación con los resultados del LLNA se calcularon teniendo en cuenta todos los datos presentados al LRUE del CEVMA para la evaluación y revisión *inter pares* del método

▼M7

de
ensayo (14). Estas cifras son similares a las publicadas recientemente sobre la base de ensayos internos de unas 145 sustancias (77 % de exactitud, 79 % de sensibilidad, 72 % de especificidad) (13). Es más probable que el ensayo KeratinoSens™ subestime los productos que muestran una potencia de sensibilización cutánea baja o moderada (es decir, subcategoría 1B del SGA de la ONU o del CLP) que los productos que presentan una potencia de sensibilización cutánea elevada (es decir, subcategoría 1A del SGA de la ONU o del CLP) (13) (14). En conjunto, esta información indica la utilidad del ensayo KeratinoSens™ para contribuir a la identificación del peligro de sensibilización cutánea. Sin embargo, los valores de la exactitud aquí indicados para el ensayo KeratinoSens™ utilizado como único método de ensayo solo son indicativos, ya que el método de ensayo debe considerarse en combinación con otras fuentes de información en el contexto de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones del punto 9 anterior. Por otra parte, a la hora de evaluar los métodos de ensayo de la sensibilización cutánea sin animales, debe tenerse en cuenta que el LLNA y otros ensayos con animales pueden no reflejar plenamente la situación en la especie de interés, es decir, los seres humanos.

El término «producto problema» se utiliza en el presente método de ensayo para referirse a lo que se somete a ensayo y no está relacionado con la aplicabilidad del método de ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2 al ensayo de sustancias o mezclas. Sobre la base de los datos disponibles actualmente, se ha demostrado que el ensayo KeratinoSens™ es aplicable a productos problema que abarcan una variedad de grupos funcionales orgánicos, mecanismos de reacción, potencias de sensibilización cutánea (determinada con estudios *in vivo*) y propiedades fisicoquímicas (9) (12) (13) (14). Se han sometido a ensayo principalmente sustancias con un solo componente, aunque también existe una cantidad limitada de datos sobre ensayos de mezclas (20). Sin embargo, el método de ensayo es técnicamente aplicable a los ensayos de sustancias de componentes múltiples y de mezclas. No obstante, antes de la utilización de este método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines reglamentarios, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la reglamentación impone el ensayo de la mezcla. Por otra parte, al ensayar sustancias de componentes múltiples o mezclas, deben tenerse en cuenta las posibles interferencias de componentes citotóxicos con las respuestas obtenidas. El método de ensayo es aplicable a productos problema solubles o que formen una dispersión estable (es decir, un coloide o una suspensión en que el producto problema no sedimente ni se separe del disolvente para formar distintas fases) en agua o en DMSO (incluyendo todos los componentes del producto problema en caso de que se realice el ensayo de una sustancia de componentes múltiples o una mezcla). Los productos problema que no cumplan estas condiciones a la concentración final más elevada requerida de 2 000 μM (véase el punto 22) pueden someterse a ensayo a concentraciones más bajas. En tal caso, los resultados que reúnan los criterios de positividad descritos en el punto 39 pueden utilizarse para apoyar la identificación del producto problema como sensibilizante cutáneo, mientras que un resultado negativo obtenido con concentraciones < 1 000 μM debe considerarse como no concluyente (véase el modelo de predicción en el punto 39). En general, se han sometido a ensayo con éxito sustancias con Log P de hasta 5, mientras que las sustancias extremamente hidrófobas con Log P por encima de 7 se encuentran fuera de la aplicabilidad conocida del método de ensayo (14). Sobre las sustancias cuyo Log P está comprendido entre 5 y 7, solo se dispone de información limitada.

Los resultados negativos deben interpretarse con cautela, ya que las sustancias con reactividad exclusiva frente a los residuos de lisina pueden detectarse como negativas por el método de ensayo. Por otra parte, debido a la limitada capacidad metabólica de la línea celular utilizada (21) y debido a las condiciones experimentales, pueden obtenerse también resultados negativos con los pro-haptenos (es decir, productos que requieren activación enzimática, por ejemplo mediante enzimas P450) y pre-haptenos (es decir, productos activados por auto-oxidación), en particular con una baja velocidad de oxidación. Los productos problema que no actúan como sensibilizantes pero que, no obstante, provocan agresión química pueden dar lugar, en cambio, a resultados positivos falsos (14). Por otra parte, no siempre es posible someter a ensayo de forma fiable los productos problema muy citotóxicos. Por último, los productos problema que interfieran con la enzima luciferasa pueden afectar a la actividad de esta en ensayos con células, provocando inhibición o aumento aparentes de la luminiscencia (22). Por ejemplo, se ha informado de que las concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 μM interfieren con las señales de luminiscencia en otros ensayos de luciferasa con

▼M7

gen marcador debido a la sobreactivación del gen marcador de la luciferasa (23). Como consecuencia, debe examinarse detenidamente la expresión de la luciferasa obtenida a altas concentraciones de fitoestrógenos o de productos similares sospechosos de provocar la sobreactivación fitoestrogenoide del gen marcador de la luciferasa (23). En los casos en que haya pruebas sobre la inaplicabilidad del método de ensayo a otras categorías específicas de productos problema, el método de ensayo no deberá utilizarse con tales categorías específicas.

Además del apoyo a la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes, el ensayo KeratinoSens™ también ofrece información sobre la relación concentración-respuesta que puede contribuir potencialmente a la evaluación de la potencia de sensibilización cuando se utiliza en enfoques integrados, como los IATA (19). Sin embargo, es necesario seguir trabajando, preferentemente a partir de datos fiables obtenidos con seres humanos, para determinar cómo el ensayo KeratinoSens™ puede contribuir a la evaluación de la potencia (24) y a la subcategorización de los sensibilizantes de acuerdo con el SGA de la ONU o del CLP.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método de ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2 utiliza una línea celular adherida inmortalizada derivada de queratinocitos humanos HaCaT transinfectados de forma estable con un plásmido seleccionable. La línea celular contiene el gen de la luciferasa bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo fusionado con un elemento ARE de un gen conocido por elevar su expresión ante la presencia de sensibilizantes por contacto (25) (26). La señal de la luciferasa refleja la activación, provocada por los sensibilizantes, de los genes dependientes de Nrf2 endógeno, y se ha demostrado que la señal de la luciferasa en la línea celular recombinante depende del Nrf2 (27). Esto permite la medición cuantitativa (mediante detección de la luminiscencia) de la inducción del gen de la luciferasa, utilizando sustratos de luciferasa bien conocidos que producen luz, como indicador de la actividad del factor de transcripción Nrf2 en las células tras su exposición a sustancias electrofílicas.

Los productos problema se consideran positivos en el ensayo KeratinoSens™ si provocan de forma estadísticamente significativa la inducción de la actividad de la luciferasa por encima de un determinado umbral (es decir, un factor multiplicador > 1,5 o un incremento del 50 %), por debajo de una concentración definida que no afecte de forma significativa a la viabilidad celular (es decir, de menos de 1 000 μM y a una concentración en la que la viabilidad celular se sitúe por encima del 70 % (9) (12)). Con este fin, se determina el factor multiplicador máximo de la inducción de la actividad de la luciferasa respecto al testigo de disolvente (negativo) ($I_{máx}$). Por otra parte, como se exponen las células a una serie de concentraciones de los productos problema, la concentración necesaria para una inducción estadísticamente significativa de la actividad de la luciferasa por encima del umbral (es decir, valor $EC_{1,5}$) se interpolará a partir de la curva dosis-respuesta (para el cálculo, véase el punto 32). Por último, debe procederse a medir en paralelo la citotoxicidad con el fin de evaluar si se dan niveles de inducción de la actividad de la luciferasa a concentraciones subcitotóxicas.

Antes de proceder al uso sistemático del ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2 según el presente método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias recomendadas al efecto en el apéndice 2.

Se dispone de normas de comportamiento (28) para facilitar la validación de métodos de ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2 *in vitro* nuevos o modificados, similares al ensayo KeratinoSens™, las cuales permiten la oportuna modificación del presente método de ensayo para su inclusión. La mutua aceptación de datos (MAD) con arreglo al acuerdo de la OCDE solo estará garantizada respecto a métodos de ensayo validados de conformidad con dichas normas de comportamiento, si estos métodos de ensayo han sido revisados e incluidos en las correspondientes directrices de ensayo por la OCDE.

▼M7

PROCEDIMIENTO

En la actualidad, el único método que se acoge al presente método de ensayo es el ensayo KeratinoSens™ científicamente válido (9) (12) (13) (14). Se dispone de procedimientos normalizados de trabajo (*Standard Operating Procedures*, SOP) para el ensayo KeratinoSens™ y deben emplearse cuando se aplica y utiliza el método de ensayo en el laboratorio (15). Los laboratorios que deseen aplicar el método de ensayo pueden obtener la línea celular recombinante utilizada en el ensayo KeratinoSens™ estableciendo un acuerdo de licencia con el creador del método de ensayo. En los siguientes puntos se ofrece una descripción de los principales componentes y procedimientos del método de ensayo de la luciferasa Are-Nrf 2.

**Preparación de los cultivos de queratinocitos**

Debe utilizarse una línea celular transgénica con una inserción estable del gen marcador de la luciferasa bajo el control del elemento ARE (por ejemplo, la línea celular de KeratinoSens™). Una vez recibidas, las células se propagan (por ejemplo, se someten a 2-4 pases) y se conservan congeladas como una población homogénea. Las células de esta población original pueden propagarse hasta un número máximo de pases (que es de 25 en el caso de KeratinoSens™) y se emplean para los ensayos sistemáticos utilizando el medio adecuado de mantenimiento (en el caso de KeratinoSens™, se trata de DMEM con suero y geneticina).

Para el ensayo, las células deben tener una confluencia de entre el 80 y el 90 %, y debe velarse por que las células nunca se cultiven hasta su confluencia total. Un día antes del ensayo, se recolectan las células y se distribuyen en placas de 96 pocillos (10 000 células/pocillo en el caso del KeratinoSens™). Debe prestarse atención para evitar la sedimentación de las células durante la siembra, a fin de garantizar la distribución de un número homogéneo de células en todos los pocillos. Si no se hace así, este paso podría ocasionar una elevada variabilidad entre pocillos. En cada repetición se utilizan tres réplicas para las mediciones de la actividad de la luciferasa, y una réplica en paralelo para el ensayo de la viabilidad celular.

**Preparación del producto problema y de las sustancias testigo**

El producto problema y las sustancias testigo se preparan el día del ensayo. Para el ensayo de KeratinoSens™, se disuelven los productos problema en dimetilsulfóxido (DMSO) a la concentración final deseada (por ejemplo, 200 mM). Las soluciones en DMSO pueden considerarse auto-esterilizantes, por lo que no es necesaria su esterilización por filtración. Los productos problema insolubles en DMSO se disuelven en agua o medio de cultivo estéril, y las soluciones se esterilizan, por ejemplo mediante filtración. En el caso de un producto problema que no tenga peso molecular (PM) definido, se prepara una solución madre a una concentración por defecto (40 mg/ml o 4 % (p/v) en el ensayo de KeratinoSens™). En caso de que se utilicen disolventes distintos del DMSO, el agua o el medio de cultivo, debe proporcionarse una justificación científica suficiente.

A partir de las soluciones madre del producto problema en DMSO, se realizan diluciones seriadas con DMSO para obtener doce concentraciones principales del producto problema (de 0,098 a 200 mM en el ensayo de KeratinoSens™). En caso de que el producto problema sea insoluble en DMSO, las diluciones para obtener las concentraciones principales se realizan con agua estéril o medio de cultivo estéril. Independiente del disolvente utilizado, las concentraciones principales se vuelven a diluir a continuación con un factor de dilución de 25 en medio de cultivo que contenga suero, y, por último, se utilizan para el tratamiento con un factor de dilución adicional de 4, de forma que las concentraciones finales de producto problema se encuentren en el intervalo de 0,98 a 2 000 µM en el ensayo de KeratinoSens™. Se pueden aplicar otras concentraciones previa justificación (por ejemplo, en caso de citotoxicidad o escasa solubilidad).

El testigo negativo (disolvente) utilizado en el ensayo de KeratinoSens™ es DMSO (nº CAS 67-68-5, pureza ≥ 99 %), para el cual se preparan seis pocillos por placa. Se somete a la misma dilución descrita para las concentraciones principales en el punto 22, de modo que la concentración final del testigo negativo (disolvente) sea del 1 %, de la que se sabe que no afecta a la viabilidad

▼M7

de las células y corresponde a la misma concentración de DMSO que se encuentra en el producto problema y en el testigo positivo. En caso de productos problema insolubles en DMSO, cuyas diluciones se han realizado en agua, el nivel de DMSO en todos los pocillos de la solución problema final debe ajustarse al 1 %, como para los demás productos problema y sustancias testigo.

El testigo positivo utilizado en el caso del ensayo de KeratinoSens™ es el aldehído cinámico (n.º CAS 14371-10-9, pureza ≥ 98 %), del cual se prepara una serie de cinco concentraciones principales en el intervalo de 0,4 a 6,4 mM en DMSO (a partir de una solución madre de 6,4 mM), que se diluyen como se describe para las concentraciones principales en el punto 22, de forma que la concentración final del testigo positivo se encuentre en el intervalo de 4 a 64 μM. Pueden utilizarse otros testigos positivos adecuados que den preferentemente valores de $EC_{1,5}$ en la gama media, si se dispone de datos históricos para obtener criterios comparables de aceptación de las tandas.

**Aplicación del producto problema y de las sustancias testigo**

Para deducir una predicción (positiva o negativa), con cada producto problema y sustancia testigo positivo es necesario hacer un solo experimento, compuesto al menos de dos repeticiones independientes, con tres réplicas en cada una de ellas (es decir, n = 6). En caso de resultados discordantes entre las dos repeticiones independientes, debe realizarse una tercera repetición con tres réplicas (es decir, n = 9). Cada repetición independiente se realiza un día diferente con nueva solución madre de los productos problema y células recolectadas de forma independiente. No obstante, las células pueden proceder del mismo pase.

Después de la siembra, según se describe en el punto 20, las células se cultivan durante 24 horas en placas de microvaloración de 96 pocillos. A continuación se retira el medio y se sustituye por medio de cultivo fresco (150 μl de medio de cultivo con suero pero sin geneticina en el caso de KeratinoSens™) al que se añaden 50 μl de las soluciones de producto problema y de las sustancias testigo diluidas con un factor de 25. Debe dejarse vacío al menos un pocillo por placa (sin células y sin tratamiento) para evaluar los valores de fondo.

A continuación se incuban las placas tratadas, durante unas 48 horas a 37 ± 1 °C en presencia de un 5 % de $CO_2$ en el ensayo de KeratinoSens™. Deben tomarse precauciones para evitar la evaporación de los productos problema volátiles y la contaminación cruzada entre pocillos por productos problema, por ejemplo cubriendo las placas con una hoja antes de la incubación con los productos problema.

**Mediciones de la actividad de la luciferasa**

Tres elementos son fundamentales para garantizar una lectura adecuada de la luminiscencia:

— la elección de un luminómetro sensible,

— la utilización de un formato de placa con suficiente altura para evitar la contaminación lumínica cruzada; y

— la utilización de un sustrato de la luciferasa con un rendimiento lumínico suficiente para garantizar una sensibilidad suficiente y una baja variabilidad.

Antes de los ensayos, debe efectuarse un experimento de control, dispuesto tal como se describe en el apéndice 3, para cerciorarse de que se cumplen estos tres puntos.

Tras el período de exposición de 48 horas con el producto problema y las sustancias testigo en el ensayo de KeratinoSens™, las células se lavan con una solución salina amortiguadora de fosfato, y se añade a cada pocillo la solución amortiguadora de lisis correspondiente para las lecturas de luminiscencia durante 20 minutos a temperatura ambiente.

▼M7

A continuación se ponen las placas con el lisado celular en el luminómetro para el proceso de lectura, que en el ensayo de KeratinoSens™ se programa de la forma siguiente: i) se añade el sustrato de la luciferasa a cada pocillo (es decir, 50 µl), ii) se espera 1 segundo, y iii) se integra la actividad de la luciferasa durante 2 segundos. Debe justificarse, en su caso, la utilización de una configuración diferente, por ejemplo en función del modelo de luminómetro utilizado. Además, también puede utilizarse un sustrato brillante, siempre que el experimento de control de la calidad del apéndice 3 se complete con éxito.

**Evaluación de la citotoxicidad**

Para el ensayo de viabilidad celular de KeratinoSens™, después del periodo de exposición de 48 horas se sustituye el medio por medio fresco que contiene MTT [bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difeniltetrazolio, azul de tiazolilo; n.º CAS 298-93-1) y las células se incuban durante 4 horas a 37 °C en presencia de 5 % de $CO_2$. A continuación, se retira el medio con MTT y las células se lisan (p. ej., añadiendo a cada pocillo solución de SDS al 10 %) hasta el día siguiente. Después de agitar, se mide la absorción a 600 nm con un fotómetro.

DATOS E INFORME

**Evaluación de los datos**

En el ensayo de KeratinoSens™ se calculan los siguientes parámetros:

— el valor máximo del factor multiplicador medio de la inducción de la actividad de la luciferasa ($I_{máx}$) observado a cualquier concentración del producto problema y del testigo positivo;

— el valor de $EC_{1,5}$, que representa la concentración a la cual el factor multiplicador de la inducción de la actividad de la luciferasa supera el umbral de 1,5 (es decir, aumento del 50 % en la actividad de la luciferasa); y

— los valores de concentración $IC_{50}$ e $IC_{30}$, correspondientes a una reducción de la viabilidad celular del 50 % y del 30 %.

— El factor multiplicador de la inducción de la actividad de la luciferasa se calcula mediante la ecuación 1, y el factor multiplicador máximo general de la inducción ($I_{máx}$) se calcula como la media aritmética de las distintas repeticiones.

*Ecuación 1:*

$$Factor\ multiplicador\ inducción = \frac{(L_{muestra} - L_{blanco})}{(L_{disolvente} - L_{blanco})}$$

donde

$L_{muestra}$ es la lectura de la luminiscencia del pocillo del producto problema

$L_{blanco}$ es la lectura de la luminiscencia del pocillo del blanco, sin células ni tratamiento

$L_{disolvente}$ es la lectura de luminiscencia media de los pocillos que contienen células y testigo de disolvente (negativo)

La $EC_{1,5}$ se calcula por interpolación lineal según la ecuación 2, y la $EC_{1,5}$ general se calcula como la media geométrica de las distintas repeticiones.

*Ecuación 2:*

$$EC1{,}5 = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1{,}5 - I_\alpha}{I_b - I_\alpha}\right) + C_\alpha$$

▼M7

donde

$C_a$ es la concentración mínima en μM con factor multiplicador de la inducción > 1,5

$C_b$ es la concentración máxima en μM con factor multiplicador de la inducción < 1,5

$I_a$ es el factor multiplicador de la inducción medido a la concentración mínima con factor multiplicador de la inducción > 1,5 (media de tres pocillos replicados)

$I_b$ es el factor multiplicador de la inducción medido a la concentración máxima con factor multiplicador de la inducción < 1,5 (media de tres pocillos replicados)

La viabilidad se calcula mediante la ecuación 3:

*Ecuación 3:*

$$Viabilidad = \frac{(V_{muestra} - V_{blanco})}{V_{disolvente} - V_{blanco}} \times 100$$

donde

$V_{muestra}$ es la lectura de la absorbancia con MTT en el pocillo del producto problema

$V_{blanco}$ es la lectura de la absorbancia con MTT en el pocillo del blanco, sin células ni tratamiento

$V_{disolvente}$ es la lectura de la absorbancia media con MTT en los pocillos que contienen células y testigo de disolvente (negativo)

Las $IC_{50}$ e $IC_{30}$ se calculan por interpolación lineal según la ecuación 4, y las $IC_{50}$ e $IC_{30}$ generales se calculan como la media geométrica de las distintas repeticiones.

*Ecuación 4:*

$$IC_x = (C_b - C_\alpha) \times \left( \frac{(100 - x) - V_\alpha}{V_b - V_\alpha} \right) + C_\alpha$$

donde

X es el porcentaje de reducción a la concentración que debe calcularse (50 y 30 para $IC_{50}$ e $IC_{30}$)

$C_a$ es la concentración mínima en μM con una reducción > x % en la viabilidad

$C_b$ es la concentración máxima en μM con una reducción < x % en la viabilidad

$V_a$ es el % de viabilidad a la concentración mínima con una reducción > x % en la viabilidad

$V_b$ es el % de viabilidad a la concentración máxima con una reducción < x % en la viabilidad

Para cada concentración que presente un factor de inducción de la actividad de la luciferasa > 1,5, se calcula la significación estadística (por ejemplo, mediante una prueba t de Student de dos colas), comparando los valores de luminiscencia de las tres muestras replicadas con los valores de luminiscencia de los pocillos de testigo de disolvente (negativo) para determinar si la inducción de la actividad de la luciferasa es estadísticamente significativa ($p$< 0,05). La concentración mínima con factor de inducción de la actividad de la luciferasa > 1,5 es el valor que determina el valor de $EC_{1,5}$. Se comprueba en cada caso si este valor es inferior al valor de $IC_{30}$, lo que indica que hay menos del 30 % de reducción de la viabilidad celular a la concentración que determina la $EC_{1,5}$.

▼M7

Se recomienda comprobar los datos visualmente con ayuda de gráficos. Si no se observa una curva dosis-respuesta clara, o si la curva dosis-respuesta obtenida es bifásica (es decir, cruza dos veces el umbral de 1,5), el experimento debe repetirse para comprobar si esto es específico del producto problema o se debe a un artefacto experimental. En caso de que la respuesta bifásica sea reproducible en un experimento independiente, debe indicarse el menor valor de $EC_{1,5}$ (la concentración cuando se cruza el umbral de 1,5 por primera vez).

En los raros casos en que se observa un factor de inducción estadísticamente no significativo por encima de 1,5, seguido de una concentración más elevada con factor de inducción estadísticamente significativo, los resultados de esta repetición se consideran válidos y positivos solo si el factor de inducción estadísticamente significativo por encima de 1,5 se ha obtenido con una concentración no citotóxica.

Por último, en el caso de productos problema que presenten un factor de inducción igual o superior a 1,5 ya a la concentración de ensayo mínima de 0,98 μM, el valor de $EC_{1,5} < 0,98$ se establece en función de la inspección visual de la curva dosis-respuesta.

**Criterios de aceptación**

Deben cumplirse los siguientes criterios de aceptación cuando se use el ensayo de KeratinoSens™. En primer lugar, el factor de inducción de la actividad de la luciferasa obtenido con el testigo positivo, el aldehído cinámico, debe estar de forma estadísticamente significativa por encima del umbral de 1,5 (por ejemplo, utilizando una prueba T) a al menos una de las concentraciones ensayadas (de 4 a 64 μM).

En segundo lugar, el valor de $EC_{1,5}$ debe estar situado en el margen de dos desviaciones típicas respecto a la media histórica de la instalación de ensayo (por ejemplo, entre 7 μM y 30 μM sobre la base del conjunto de datos de la validación) y estos valores deben actualizarse periódicamente. Además, el factor medio de inducción en las tres réplicas con aldehído cinámico a 64 μM debe situarse entre 2 y 8. Si este último criterio no se cumple, deberá comprobarse cuidadosamente la relación dosis-respuesta del aldehído cinámico, y los ensayos podrán aceptarse solo si existe una clara relación dosis-respuesta con un aumento de la inducción de la actividad de la luciferasa al incrementar las concentraciones del testigo positivo.

Por último, el coeficiente medio de variación de la lectura de la luminiscencia del testigo negativo de DMSO (disolvente) debe ser inferior al 20 % en cada repetición consistente en seis pocillos ensayados por triplicado. Si la variabilidad es superior, los resultados deben desecharse.

**Interpretación de los resultados y modelo de predicción**

Una predicción de KeratinoSens™ se considera positiva si las siguientes cuatro condiciones se cumplen en su totalidad en 2 repeticiones de 2 o en las mismas 2 repeticiones de 3; de lo contrario, la predicción de KeratinoSens™ se considera negativa (figura 1):

1. El factor de inducción $I_{máx}$ es superior (>) a 1,5 y presenta una diferencia estadísticamente significativa respecto al testigo de disolvente (negativo) (determinado mediante una prueba t de Student, desapareada, de dos colas);

2. La viabilidad celular es superior (>) al 70 % a la concentración mínima con factor de inducción de la actividad de la luciferasa por encima de 1,5 (es decir, a la concentración que determina la $EC_{1,5}$);

3. El valor de $EC_{1,5}$ es inferior (<) a 1 000 μM (o < 200 μg/ml en el caso de los productos problema sin peso molecular definido);

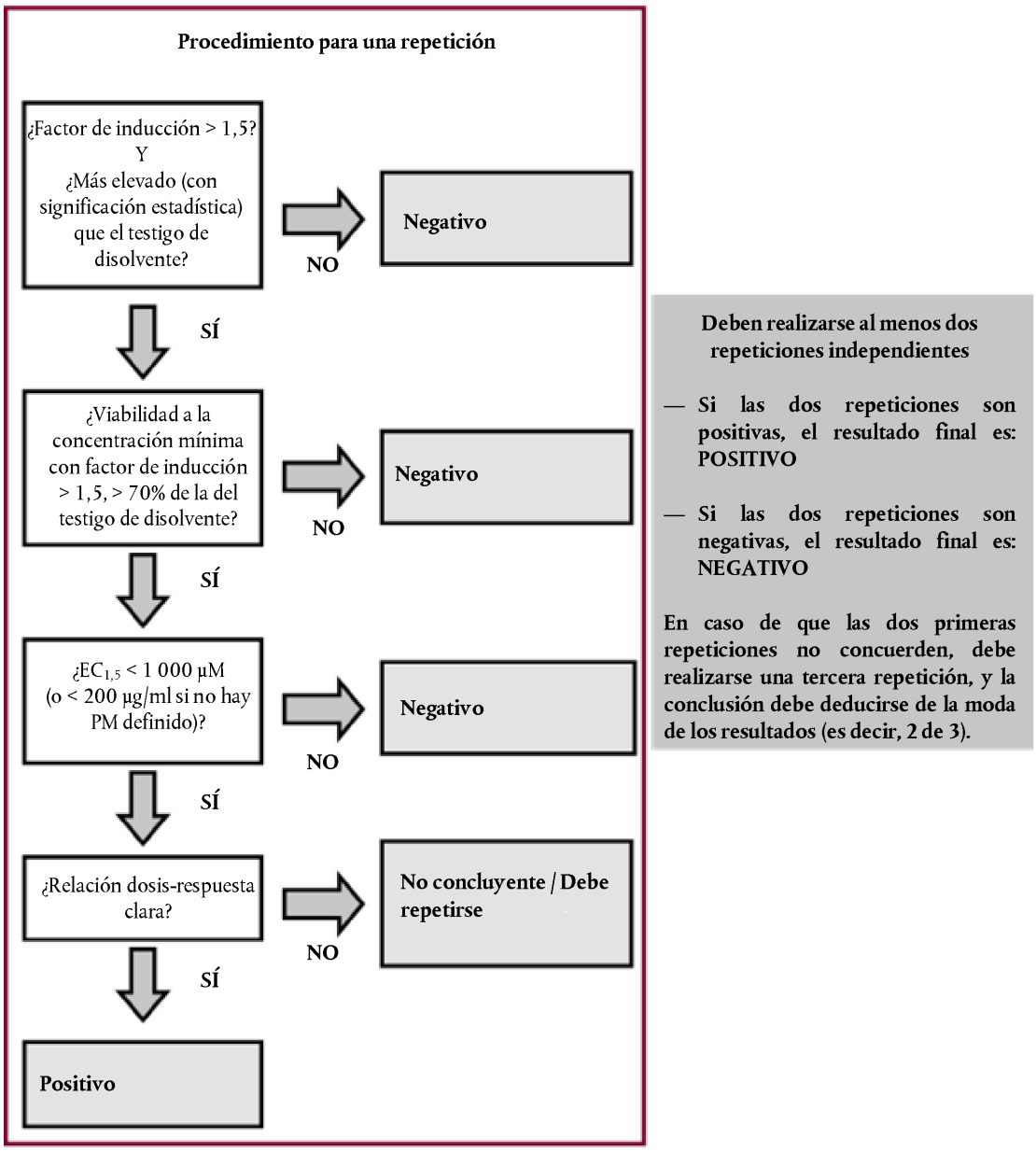
4. Hay una relación dosis-respuesta general visible en cuanto a la inducción de la luciferasa (o una respuesta bifásica mencionada en el punto 33).

▼M7

Si en una determinada repetición se cumplen las tres primeras condiciones, pero no puede observarse una clara relación dosis-respuesta para la inducción de la luciferasa, entonces el resultado de dicha repetición debe considerarse no concluyente y podrá ser necesario proceder a efectuar más ensayos (figura 1). Además, un resultado negativo obtenido con concentraciones < 1 000 µM (o < 200 µg/ml en caso de productos problema sin peso molecular definido) también ha de considerarse no concluyente (véase el punto 11).

*Figura 1:*

**Modelo de predicción utilizado en el ensayo de KeratinoSens™. Las predicciones del ensayo de KeratinoSens™ deben tenerse en cuenta en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 9 y 11.**




En algunos raros casos, los productos problema que inducen la actividad de la luciferasa muy cerca de los niveles citotóxicos pueden ser positivos en algunas repeticiones a niveles no citotóxicos (es decir, a la concentración que determina la $EC_{1,5}$ por debajo (<) de la $IC_{30}$), y en otras repeticiones solo a niveles citotóxicos (es decir, a la concentración que determina la $EC_{1,5}$ por encima (>) de la $IC_{30}$). Tales productos problema se volverán a someter a ensayo con un

▼M7

análisis de la relación dosis-respuesta más estrecho utilizando un factor de dilución inferior (por ejemplo, factor de dilución de 1,33 o Ö2 (= 1,41) entre pocillos), para determinar si la inducción se ha producido o no a niveles citotóxicos (9).

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema*

— Sustancia con un solo componente

  — Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

  — Aspecto físico, hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

  — Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

  — Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

  — Concentración o concentraciones estudiadas;

  — Condiciones de almacenamiento y estabilidad en la medida de lo posible.

— Sustancia de componentes múltiples, sustancia UVCB y mezcla:

  — Caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), en la medida de lo posible;

  — Aspecto físico, hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

  — Peso molecular o peso molecular aparente en el caso de mezclas/polímeros de composición conocida u otra información pertinente para la realización del estudio;

  — Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

  — Concentración o concentraciones estudiadas;

  — Condiciones de almacenamiento y estabilidad en la medida de lo posible.

*Testigos*

— Testigo positivo

  — Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

  — Aspecto físico, hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible y en los casos aplicables;

  — Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

  — Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

  — Concentración o concentraciones estudiadas;

  — Condiciones de almacenamiento y estabilidad en la medida de lo posible;

▼M7

— Referencia a los resultados de los testigos positivos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación de las tandas, si procede.

— Testigo negativo (vehículo)

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, y/u otros identificadores;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Aspecto físico, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes en el caso de que se utilicen testigos negativos /vehículos distintos de los especificados en el presente método de ensayo y en la medida de lo posible;

— Condiciones de almacenamiento y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente para cada producto problema.

*Condiciones del método de ensayo*

— Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;

— Descripción del método de ensayo utilizado;

— Línea celular utilizada, sus condiciones de almacenamiento y su origen (por ejemplo, instalación en la que se ha obtenido);

— Número de pases y nivel de confluencia de las células utilizadas en el ensayo;

— Método de recuento de células utilizado para la siembra antes del ensayo, y medidas adoptadas para garantizar la homogeneidad de la distribución del número de células (véase el punto 20);

— Luminómetro utilizado (por ejemplo, modelo), incluidos los ajustes instrumentales, sustrato de luciferasa utilizado, y demostración de las mediciones adecuadas de luminiscencia sobre la base del ensayo de control descrito en el apéndice 3;

— Procedimiento utilizado para demostrar la competencia del laboratorio en cuanto a la utilización del método de ensayo (por ejemplo, mediante el ensayo de sustancias de la prueba de la competencia) o para demostrar que el método de ensayo proporciona resultados reproducibles a lo largo del tiempo.

*Procedimiento de ensayo*

— Número de repeticiones y réplicas utilizadas;

— Concentraciones del producto problema, procedimiento de aplicación y tiempo de exposición utilizado (si es diferente del recomendado)

— Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;

— Descripción de los criterios de aceptación del estudio seguidos;

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo.

*Resultados*

— Tabulación de $I_{max}$, $EC_{1,5}$ y de los valores de la viabilidad (es decir, $IC_{50}$, $IC_{30}$) obtenidos con el producto problema y con el testigo positivo en cada repetición, así como los valores medios ($I_{max}$: media aritmética; $EC_{1,5}$ y valores de la viabilidad: media geométrica) y la desviación típica calculados con los datos obtenidos en las distintas repeticiones y una indicación de la calificación del producto problema según el modelo de predicción;

▼M7

— Coeficiente de variación obtenido con las lecturas de luminiscencia del testigo negativo, en cada experimento;

— Gráfico que muestre las curvas dosis-respuesta en cuanto a la inducción de la actividad de la luciferasa y la viabilidad;

— Descripción de cualesquiera otras observaciones pertinentes, si procede.

*Discusión de los resultados*

— Discusión de los resultados obtenidos con el método de ensayo Keratino-Sens™;

— Consideración de los resultados obtenidos con el método de ensayo en el contexto de un enfoque IATA si se dispone de otra información pertinente.

*Conclusión*

BIBLIOGRAFÍA

(1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA), quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2013. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html

(2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 168. OECD, Paris.

(3) Adler S., Basketter D., Creton S., Pelkonen O., van Benthem J., Zuang V., Andersen K.E., Angers-Loustau A., Aptula A., Bal-Price A., Benfenati E., Bernauer U., Bessems J., Bois F.Y., Boobis A., Brandon E., Bremer S., Broschard T., Casati S., Coecke S., Corvi R., Cronin M., Daston G., Dekant W., Felter S., Grignard E., Gundert-Remy U., Heinonen T., Kimber I., Kleinjans J., Komulainen H., Kreiling R., Kreysa J., Leite S.B., Loizou G., Maxwell G., Mazzatorta P., Munn S., Pfuhler S., Phrakonkham P., Piersma A., Poth A., Prieto P., Repetto G., Rogiers V., Schoeters G., Schwarz M., Serafimova R., Tähti H., Testai E., van Delft J., van Loveren H., Vinken M., Worth A., Zaldivar J.M. (2011). Alternative (non-animal) methods for cosmetics testing: current status and future prospects-2010. Archives of Toxicology 85, 367-485.

(4) Capítulo B.42 del presente anexo, Sensibilización cutánea: ensayo con ganglios linfáticos locales.

(5) Capítulo B.6 del presente anexo, Sensibilización de la piel.

(6) Capítulo B.50 del presente anexo, Sensibilización cutánea: ensayo con ganglios linfáticos locales: DA.

(7) Capítulo B.51 del presente anexo: Sensibilización cutánea: ensayo con ganglios linfáticos locales: BrdU-ELISA.

(8) Natsch A. (2010). The Nrf2-Keap1-ARE Toxicity Pathway as a Cellular Sensor for Skin Sensitizers-Functional Relevance and Hypothesis on Innate Reactions to Skin Sensitizers. Toxicological Sciences 113, 284-292.

(9) Emter R., Ellis G., Natsch A. (2010). Performance of a novel keratinocyte-based reporter cell line to screen skin sensitizers *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology 245, 281-290.

(10) Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., Kensler T.W. (2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. Chem. Res. Toxicol. 18, 1779-1791.

▼M7

(11) Kansanen E., Kuosmanen S.M., Leinonen H., Levonen A.L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. Redox Biol. 1(1), 45-49.

(12) Natsch A., Bauch C., Foertsch L., Gerberick F., Normann K., Hilberer A., Inglis H., Landsiedel R., Onken S., Reuter H., Schepky A., Emter R. (2011). The intra- and inter-laboratory reproducibility and predictivity of the KeratinoSens assay to predict skin sensitizers *in vitro*: results of a ring-study in five laboratories. Toxicol. *In Vitro* 25, 733-744.

(13) Natsch A., Ryan C.A., Foertsch L., Emter R., Jaworska J., Gerberick G.F., Kern P. (2013). A dataset on 145 chemicals tested in alternative assays for skin sensitization undergoing prevalidation. Journal of Applied Toxicology, 33, 1337-1352.

(14) LRUE del ECVAM (2014). Recommendation on the KeratinoSens™ assay for skin sensitisation testing, 42 pp. Available at: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations/recommendation-keratinosens-skin-sensitisation.

(15) DB-ALM (INVITTOX) Protocol 155: KeratinoSens™., 17 pp. Disponible en: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index

(16) Natsch A., Emter R., Ellis G. (2009). Filling the concept with data: integrating data from different *in vitro* and *in silico* assays on skin sensitizers to explore the battery approach for animal-free skin sensitization testing. Toxicol. Sci. 107, 106-121.

(17) Ball N., Cagen S., Carrillo J.C., Certa H., Eigler D., Emter R., Faulhammer F., Garcia C., Graham C., Haux C., Kolle S.N., Kreiling R., Natsch A., Mehling A. (2011). Evaluating the sensitization potential of surfactants: integrating data from the local lymph node assay, guinea pig maximization test, and *in vitro* methods in a weight-of-evidence approach. Regul. Toxicol. Pharmacol. 60, 389-400.

(18) Bauch C., Kolle S.N., Ramirez T., Eltze T., Fabian E., Mehling A., Teubner W., van Ravenzwaay B., Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potentials. Regul. Toxicol. Pharmacol. 63, 489-504.

(19) Jaworska J., Dancik Y., Kern P., Gerberick F., Natsch A. (2013). Bayesian integrated testing strategy to assess skin sensitization potency: from theory to practice. J Appl Toxicol. 33, 1353-1364.

(20) Andres E., Sa-Rocha V.M., Barrichello C., Haupt T., Ellis G., Natsch A. (2013). The sensitivity of the KeratinoSens™ assay to evaluate plant extracts: A pilot study. Toxicology *In Vitro* 27, 1220-1225.

(21) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch. Toxicol. 87, 1683-1969.

(22) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology. Chemistry and Biology 17, 646-657.

(23) OCDE (2012). BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD Guidelines for Chemical Testing No. 457. OECD, Paris.

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No. 87).

(25) Gildea L.A., Ryan C.A., Foertsch L.M., Kennedy J.M., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2006). Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing. J. Invest. Dermatol., 126, 1813-1822.

▼**M7**

(26) Ryan C.A., Gildea L.A., Hulette B.C., Dearman R.J., Kimber I., Gerberick G.F. (2004). Gene expressing changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen. Toxicol. Lett. 150, 301-316.

(27) Emter R., van der Veen J.W., Adamson G., Ezendam J., van Loveren H., Natsch A. (2013). Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol. *in vitro* 27, 2225-2232.

(28) OCDE (2015). Performance Standards for assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation ARE-Nrf2 luciferase test methods. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment N0 213, OCDE, París.

(29) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, Series on Testing and Assessment No.34. OCDE, París, Francia,

(30) TLCAN (NAFTA) Tratado de Libre Comercio de América del Norte) (2012). Technical Working Group on Pesticides — (Quantitative) Structure Activity Relationship ((Q)SAR) Guidance Document. 186 pp. http://www.epa.gov/oppfead1/international/naftatwg/guidance/qsar-guidance.pdf

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su «pertinencia». Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (29).

**Ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*)**: Secuencia de fenómenos desde la estructura química de un producto o grupo de productos similares diana, pasando por el fenómeno molecular desencadenante, hasta un resultado *in vivo* de interés (2).

**ARE**: Elemento de respuesta antioxidante (*antioxidant response element*), también denominado EpRE (*electrophile response element*, elemento de respuesta electrófilo), es un elemento de respuesta constatado en la región anterior del promotor de muchos genes citoprotectores y de fase II. Cuando está activado por Nfr2, sirve de mediador para la inducción transcripcional de estos genes.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Coeficiente de variación**: Medida de la variabilidad que se calcula para un grupo de datos replicados dividiendo la desviación típica por la media. Puede multiplicarse por 100 para expresarlo como porcentaje.

$\mathbf{EC_{1,5}}$: Concentración interpolada correspondiente a un factor de inducción de luciferasa igual a 1,5.

$\mathbf{IC_{30}}$: Concentración que provoca la reducción de la viabilidad celular en un 30 %.

$\mathbf{IC_{50}}$: Concentración que provoca la reducción de la viabilidad celular en un 50 %.

**Peligro**: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**Enfoque integrado de pruebas y evaluación (IATA, *Integrated Approach to Testing and Assessment*)**: Enfoque estructurado para la identificación del peligro (potencial), caracterización del peligro (potencia) o evaluación de la seguridad (potencial/potencia y exposición) de un producto o grupo de productos, que integra y pondera de forma estratégica todos los datos pertinentes para fundamentar una decisión reglamentaria relativa a posibles peligros o riesgos o a la necesidad de realizar ensayos más específicos y, por tanto, mínimos.

$\mathbf{I_{máx}}$: Factor de inducción máximo de la actividad de la luciferasa frente al testigo de disolvente (negativo) medido a cualquier concentración del producto problema.

**Keap1**: Proteína 1 asociada a ECH y de tipo Kelch (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), es una proteína sensora que puede regular la actividad del Nrf2. En ausencia de inducción, la proteína sensora Keap1 actúa sobre el factor de transcripción Nrf2 para la ubiquitinización y degradación proteolítica en el proteasoma. La modificación covalente de los residuos reactivos de cisteína de Keap1 por pequeñas moléculas puede provocar que el Nrf2 se disocie de Keap1 (8) (10) (11).

▼M7

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta por dos o más sustancias que no reaccionan en ella (1).

**Sustancia con un solo componente**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**Sustancia de componentes múltiples**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química, mientras que una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

**Nrf2**: Factor nuclear 2 similar al factor 2 derivado de eritroide, es un factor de transcripción que participa en la ruta de la respuesta antioxidante. Cuando el Nrf2 no está ubiquitinizado, se concentra en el citoplasma y se transloca al núcleo, donde se combina con el ARE en la región anterior del promotor de muchos genes citoprotectores, con lo que se inicia su transcripción (8) (10) (11).

**Testigo positivo**: Réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Pertinencia**: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (29).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (29).

**Reproducibilidad**: Coincidencia entre los resultados obtenidos en el ensayo del mismo producto utilizando el mismo protocolo de ensayo (véase «Fiabilidad») (29).

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (29).

**Testigo del disolvente/vehículo**: Réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, a excepción del producto problema, pero incluido el disolvente que se utiliza. Se emplea para determinar la respuesta de base respecto a las muestras tratadas con el producto problema disuelto en el mismo disolvente.

**Especificidad**: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (29).

**Sustancia**: Elementos químicos y sus compuestos en estado natural u obtenidos mediante cualquier proceso de producción, incluidos los aditivos necesarios para mantener la estabilidad del producto y las eventuales impurezas derivadas del proceso empleado, pero excluidos los disolventes que se puedan separar sin influir en la estabilidad de la sustancia ni cambiar su composición (1).

**Producto problema**: El término «producto problema» se utiliza para hacer referencia a lo que se somete a ensayo.

▼M7

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de la ONU)**: Sistema que propone la clasificación de productos químicos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos.

**Método de ensayo válido**: Método de ensayo del que se considera que tiene suficiente pertinencia y fiabilidad con un fin específico y que se basa en principios sólidos desde el punto de vista científico. Un método de ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado (29).

▼M7

*Apéndice 2*

**SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA**

**Sensibilización cutánea *in vitro*: Método de ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2**

Antes de proceder al uso sistemático de este método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta obtención de la predicción del KeratinoSens™ prevista respecto a las diez sustancias recomendadas al efecto en el cuadro 1, y la obtención de valores de $EC_{1,5}$ e $IC_{50}$ que estén dentro de la gama de referencia respectiva con al menos ocho de las diez sustancias utilizadas para demostrar la competencia. Estas sustancias de la prueba de la competencia se han seleccionado a fin de representar la gama de respuestas correspondientes a los peligros de sensibilización cutánea. Otros criterios de selección son la disponibilidad comercial, la disponibilidad de referencias *in vivo* de alta calidad, y la disponibilidad de datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el ensayo de KeratinoSens™.

*Cuadro 1*

**Sustancias recomendadas para demostrar la competencia técnica con el ensayo de KeratinoSens™**

| Sustancias de la prueba de la competencia | CAS RN | Estado físico | Predicción *in vivo* (1) | Predicción de KeratinoSens™ (2) | Gama de referencia de $EC_{1,5}$ (μM) (3) | Gama de referencia de $IC_{50}$ (μM) (3) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Isopropanol | 67-63-0 | Líquido | No sensibilizante | Negativa | > 1 000 | > 1 000 |
| Ácido salicílico | 69-72-7 | Sólido | No sensibilizante | Negativa | > 1 000 | > 1 000 |
| Ácido láctico | 50-21-5 | Líquido | No sensibilizante | Negativa | > 1 000 | > 1 000 |
| Glicerol | 56-81-5 | Líquido | No sensibilizante | Negativa | > 1 000 | > 1 000 |
| Alcohol cinámico | 104-54-1 | Sólido | Sensibilizante (escaso) | Positiva | 25 — 175 | > 1 000 |
| Dimetacrilato de etilenglicol | 97-90-5 | Líquido | Sensibilizante (escaso) | Positiva | 5 — 125 | ≤ 500 |
| 2-Mercaptobenzotiazol | 149-30-4 | Sólido | Sensibilizante (moderado) | Positiva | 25 — 250 | ≤ 500 |
| Metildibromo-glutaronitrilo | 35691-65-7 | Sólido | Sensibilizante (intenso) | Positiva | > 20 | 20 — 100 |
| Sulfato de 4-metilaminofenol | 55-55-0 | Sólido | Sensibilizante (intenso) | Positiva | > 12,5 | 20 — 200 |
| 2,4-Dinitro-clorobenceno | 97-00-7 | Sólido | Sensibilizante (extremo) | Positiva | > 12,5 | 5 — 20 |

(1) Las predicciones de peligro (y de potencia) *in vivo* se basan en datos de LLNA (13). La potencia *in vivo* se obtiene con los criterios propuestos por ECETOC (24).

(2) Las predicciones del ensayo de KeratinoSensTM deben tenerse en cuenta en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 9 y 11 del presente método de ensayo.

(3) Sobre la base de los valores observados históricos (12).

▼M7

*Apéndice 3*

**CONTROL DE CALIDAD DE LAS MEDICIONES DE LUMINISCENCIA**

**Experimento de base para garantizar unas mediciones óptimas de la luminiscencia en el ensayo de KeratinoSens™**

Los tres parámetros siguientes son esenciales para garantizar la obtención de resultados fiables con el luminómetro:

— tener sensibilidad suficiente para dar un fondo estable en los pocillos de testigo;

— no presentar gradiente a lo largo de la placa debido a largos períodos de lectura; y

— no tener contaminación luminosa en pocillos adyacentes a los pocillos muy activos.

Antes del ensayo, se recomienda velar por que las mediciones de luminiscencia sean adecuadas, comprobando una placa testigo dispuesta como se describe más abajo (análisis por triplicado).

**Disposición de la placa del primer experimento de formación**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO |
| B | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO |
| C | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO |
| **D** | **EGDMA 0,98** | **EGDMA 1,95** | **EGDMA 3,9** | **EGDMA 7,8** | **EGDMA 15,6** | **EGDMA 31,25** | **EGDMA 62,5** | **EGDMA 125** | **EGDMA 250** | **EGDMA 500** | **EGDMA 1 000** | **EGDMA 2 000** |
| E | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO |
| F | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO |
| G | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO |
| H | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | DMSO | **CA 4** | **CA 8** | **CA 16** | **CA 32** | **CA 64** | **Blanco** |

EGDMA = dimetacrilato de etilenglicol (nº CAS: 97-90-5), sustancia fuertemente inductora

CA = aldehído cinámico, referencia positiva (nº CAS: 104-55-2)

**El análisis de control de la calidad debe demostrar:**

— una clara relación dosis-respuesta en la fila D, con factor de inducción por encima del fondo $I_{máx}$ > 20 (en la mayoría de los casos, se alcanzan valores de $I_{máx}$ entre 100 y 300);

— sin relación dosis-respuesta en las filas C y E (ningún factor de inducción superior a 1,5 (idealmente, no superior a 1,3) debido a la posible contaminación lumínica especialmente cerca de los pocillos fuertemente activos de la fila del EGDMA;

— sin diferencia estadísticamente significativa entre las filas A, B, C, E, F y G (es decir, sin gradiente en la placa); y

— la variabilidad en cualquiera de las filas A, B, C, E, F y G y en los pocillos con DMSO de la fila H debe ser inferior al 20 % (es decir, fondo estable).

▼M7

## B.61. MÉTODO DE ENSAYO DE PÉRDIDA DE FLUORESCEÍNA PARA DETECTAR AGENTES CORROSIVOS E IRRITANTES INTENSOS PARA LOS OJOS

INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) de la OCDE 460 (2012). El método de ensayo de pérdida de fluoresceína (FL, *fluorescein leakage*) es un procedimiento *in vitro* que puede utilizarse, en determinadas circunstancias y con limitaciones específicas, para clasificar los productos (sustancias y mezclas) como agentes corrosivos e irritantes intensos para los ojos, según se definen en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de la ONU) (categoría 1), en el Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) ([1]) (categoría 1), y en la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA) (categoría I) (1) (2). A efectos de este método de ensayo, se entiende por «agentes irritantes intensos para los ojos» los productos que provocan lesiones tisulares en el ojo como consecuencia de la administración del producto, las cuales no son reversibles en el plazo de 21 días, o una grave reducción física de la vista, mientras que «agentes corrosivos para los ojos» son los productos que causan lesiones tisulares irreversibles en el ojo. Estos productos se clasifican en la categoría 1 del SGA de la ONU, en la categoría 1 del CLP de la UE, o en la categoría I de la EPA.

Si bien el método de ensayo FL no se considera válido para sustituir completamente al ensayo *in vivo* con ojo de conejo, sí se recomienda utilizarlo como parte de una estrategia de ensayos escalonados para la clasificación y el etiquetado reglamentarios. Así pues, se recomienda el método FL como un primer paso dentro de un enfoque descendente para identificar agentes corrosivos o irritantes intensos para los ojos, específicamente para ciertos tipos de productos (es decir, sustancias hidrosolubles y mezclas) (3) (4).

Actualmente se reconoce en general que, en un futuro próximo, ningún ensayo de irritación ocular *in vitro* podrá sustituir por sí solo al ensayo ocular *in vivo* [método de ensayo B.5 (5)] para hacer predicciones en toda la gama de irritación causada por las distintas clases de productos. Sin embargo, unas combinaciones estratégicas de varios métodos de ensayo alternativos dentro de una estrategia de ensayos (escalonados) sí podrán sustituir al ensayo ocular *in vivo* (4). El enfoque descendente (4) está diseñado para utilizarse cuando, sobre la base de la información existente, se espera que un producto tenga un alto potencial de irritación.

Sobre la base del modelo de predicción detallado en el punto 35, el método FL, dentro de un ámbito de aplicación limitado, puede identificar los productos como agentes corrosivos o irritantes intensos para los ojos (categoría 1 del SGA de la ONU; categoría 1 del CLP de la UE; categoría I de la EPA de los EE.UU.), sin necesidad de realizar más ensayos. Se acepta que lo mismo ocurre con las mezclas, aunque estas no se hayan utilizado en la validación. Por lo tanto, el método de ensayo FL puede utilizarse para determinar la capacidad de irritación/corrosión ocular de los productos, siguiendo la estrategia secuencial de ensayos del método B.5 (5). No obstante, un producto del que el método de ensayo FL no prediga que es corrosivo o irritante intenso para los ojos tendría que someterse a ensayo con uno o varios métodos de ensayo adicionales (*in vitro* o *in vivo*) capaces de identificar con exactitud: i) los productos que den resultados falsos negativos *in vitro* como agentes corrosivos/ irritantes intensos para los ojos con el método FL (categoría 1 del SGA de la ONU; categoría 1 del CLP de la UE; categoría I de la EPA de los EE.UU.); ii) los productos que no estén clasificados por corrosión/irritación ocular (sin categoría del SGA de la ONU; sin categoría del CLP de la UE; categoría IV de la EPA de los EE.UU.); y iii) los productos

([1]) Los estadísticos que siguen un enfoque de modelización como el de usar modelos lineales generales pueden plantear el análisis de forma diferente, pero comparable, sin derivar necesariamente el cuadro tradicional de ANOVA, que se basa en enfoques algorítmicos para calcular las estadísticas elaboradas en una época pre-informática.

▼M7

que sean agentes irritantes oculares leves o moderados (categorías 2A y 2B del SGA de la ONU; categoría 2 del CLP de la UE; categorías II y III de la EPA de los EE.UU.).

El objetivo del presente método de ensayo es describir los procedimientos utilizados para evaluar la posible capacidad de corrosión o de irritación intensa para los ojos de un producto problema, medida por su capacidad de provocar lesiones a una monocapa epitelial confluente impermeable. La integridad de la permeabilidad transepitelial es una importante función de los epitelios como los que se encuentran en la conjuntiva y en la córnea. La permeabilidad transepitelial está controlada por diversas uniones intercelulares herméticas. Se ha observado que el aumento de la permeabilidad del epitelio de la córnea *in vivo* está en correlación con el nivel de inflamación y de lesiones superficiales que se observan cuando se irritan los ojos.

En el método de ensayo FL, los efectos tóxicos tras un breve tiempo de exposición al producto problema se miden por el aumento de la permeabilidad a la fluoresceína sódica a través de la monocapa epitelial de células renales de perro de Madin-Darby (MDCK) cultivadas sobre elementos insertados permeables. La cantidad de fluoresceína que se pierde es proporcional a las lesiones provocadas por el producto a las uniones intercelulares herméticas, a las uniones desmosómicas y a las membranas celulares, y se puede utilizar para estimar el potencial de la toxicidad ocular de un producto problema. El apéndice 1 incluye un diagrama de células MDCK cultivadas sobre la membrana de un elemento insertado para el método de ensayo FL.

En el apéndice 2 se dan las definiciones pertinentes.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

El presente método de ensayo se basa en el Protocolo n.º 71 de INVITTOX (6), que ha sido evaluado en un estudio de validación internacional por el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA), en colaboración con el Comité de Coordinación Interagencias sobre la validación de métodos alternativos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) de los Estados Unidos, y con el Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM).

El método de ensayo FL no se recomienda para la identificación de productos que deben clasificarse como irritantes leves o moderados o de productos que no deben clasificarse como irritantes oculares (sustancias y mezclas) (es decir, sin categoría o categoría 2A/2B del SGA; sin categoría o categoría 2 del CLP de la UE; categoría II/III/IV de la EPA de los EE.UU.), según el estudio de validación (3) (7).

El método de ensayo es aplicable solo a los productos (sustancias y mezclas) hidrosolubles. La capacidad de irritación ocular intensa de los productos hidrosolubles o de aquellos cuyo efecto tóxico no se ve afectado por la dilución es predicha generalmente de forma exacta con el método de ensayo FL (7). Para clasificar un producto como hidrosoluble, en condiciones experimentales, debe ser soluble en solución salina equilibrada de Hank (HBSS) estéril, con calcio (a la concentración de 1,0-1,8 mM), sin rojo de fenol, a una concentración $\geq$ 250 mg/ml (una dosis por encima del umbral de 100 mg/ml). Sin embargo, si el producto problema es soluble a una concentración inferior a 100 mg/ml, pero a esa concentración ya induce la pérdida de fluoresceína del 20 % (lo que significa $FL_{20}$ < 100 mg/ml), puede clasificarse en la Cat. 1 del SGA o en la Cat. I de la EPA.

Las limitaciones de este método de ensayo que se han detectado excluyen de su ámbito de aplicación a los ácidos y bases fuertes, los fijadores celulares y los productos muy volátiles. Estos productos tienen mecanismos que no se miden con el método de ensayo FL como, por ejemplo, importante coagulación, saponificación o reacciones químicas específicas. Otras limitaciones de este método

▼M7

que se han detectado se basan en los resultados relativos a la capacidad de predicción con productos problema viscosos y de color (7). Parece que estos dos tipos de productos son difíciles de eliminar de la monocapa tras el breve período de exposición y que la capacidad de predicción del método de ensayo podría mejorarse con un mayor número de fases de lavado. Los productos sólidos suspendidos en líquido tienden a separarse por precipitación y puede ser difícil determinar la concentración final en contacto con las células. Si se excluyen de la base de datos los productos de estas clases químicas y físicas, mejora sustancialmente la exactitud del ensayo FL en los sistemas de clasificación de la UE, la EPA y el SGA (7).

Teniendo en cuenta la finalidad del presente método de ensayo (es decir, identificar solamente agentes corrosivos/ irritantes intensos para los ojos), las tasas de falsos negativos (véase el punto 13) no son fundamentales, ya que tales productos se someterían a otros ensayos *in vitro* validados adecuadamente o con conejos, en función de las exigencias normativas, utilizando una estrategia de ensayo secuencial con un enfoque de ponderación de los datos (5) (véanse también los puntos 3 y 4).

Otras limitaciones detectadas del método de ensayo FL se refieren a las tasas de falsos positivos y de falsos negativos. Cuando se utilizó como fase inicial dentro de un planteamiento descendente para determinar sustancias y mezclas hidrosolubles corrosivas/ irritantes intensas (categoría 1 del SGA de la ONU; categoría 1 del CLP de la UE; categoría I de la EPA de los EE.UU.), la tasa de falsos positivos del método de ensayo FL osciló entre el 7 % (7/103; SGA de la ONU y CLP de la UE) y el 9 % (9/99; EPA de los EE.UU.) y la tasa de falsos negativos osciló entre el 54 % (15/28; EPA de los EE.UU.) y el 56 % (27/48; SGA de la ONU y CLP de la UE) en comparación con los resultados *in vivo*. No se definen aquí grupos químicos que presenten falsos resultados positivos o negativos con el método de ensayo FL.

Hay ciertas limitaciones técnicas que son específicas del cultivo de células MDCK. Las uniones intercelulares herméticas que impiden el paso del colorante fluoresceína sódica a través de la monocapa se van alterando cada vez más al aumentar el número de pases celulares. La formación incompleta de estas uniones intercelulares herméticas redunda en un aumento de la pérdida de fluoresceína en los testigos sin tratar. Por lo tanto, es importante definir la pérdida máxima permisible en los testigos sin tratar (véase el punto 38: 0 % de pérdida). Como con todos los ensayos *in vitro*, existe la posibilidad de que las células se transformen a lo largo del tiempo, por lo que es fundamental que se indique la banda del número de pases en relación con los ensayos.

El actual ámbito de aplicación podría ampliarse en algunos casos, pero solo después de analizar un conjunto ampliado de datos de productos problema estudiados, obtenido preferentemente mediante ensayos (3). El presente método de ensayo se actualizará en consecuencia a la luz de la nueva información y los datos que se vayan considerando.

Cuando algún laboratorio establezca inicialmente este ensayo, debe utilizar los productos de la prueba de la competencia que se indican en el apéndice 3. Los laboratorios pueden utilizar estos productos para demostrar su competencia técnica en la realización del método de ensayo FL antes de presentar, con fines de clasificación normativa de peligros, los datos obtenidos con este ensayo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método FL es un ensayo *in vitro* que se basa en la citotoxicidad y en la función celular, realizado con una monocapa confluente de células de epitelio tubular MDCK CB997, cultivadas sobre elementos insertados semipermeables, que sirven de modelo del estado no proliferativo del epitelio corneal *in vivo*. La línea celular MDCK está bien establecida y forma uniones intercelulares herméticas y uniones desmosómicas similares a las que se encuentran en el lado apical de los epitelios conjuntival y corneal. Las uniones intercelulares herméticas y las uniones desmosómicas *in vivo* evitan que los solutos y las materias extrañas penetren en el epitelio corneal. La pérdida de la impermeabilidad transepitelial, debida a la alteración de las uniones intercelulares herméticas y de las uniones desmosómicas, constituye uno de los primeros fenómenos de la irritación ocular causada por los productos.

▼M7

El producto problema se aplica a la capa confluente de células cultivadas en el lado apical del elemento insertado. Habitualmente se utiliza una breve exposición de un minuto para reflejar la velocidad de eliminación normal en la exposición humana. Una ventaja del breve período de exposición es que las sustancias y mezclas a base de agua pueden someterse a ensayo en estado puro, si pueden retirarse fácilmente después del período de exposición. Esto permite una comparación más directa de los resultados con los efectos de los productos en los seres humanos. El producto problema se retira a continuación y el colorante fluoresceína sódica, que no es tóxico y es muy fluorescente, se añade al lado apical de la monocapa durante 30 minutos. La lesión causada por el producto problema a las uniones intercelulares herméticas se determina por la cantidad de fluoresceína que se pierde a través de la capa celular dentro de un plazo de tiempo determinado.

La cantidad de colorante fluoresceína sódica que pasa a través de la monocapa y de la membrana del elemento insertado a un volumen determinado de solución presente en el pocillo (al que llega la fluoresceína sódica perdida) se determina midiendo por espectrofluorometría la concentración de fluoresceína en el pocillo. La cantidad de fluoresceína filtrada (FL) se calcula con referencia a las lecturas de intensidad de la fluorescencia (FI) de dos testigos: un testigo en blanco, y un testigo de pérdida máxima. Se indica, en relación con estos testigos, para cada una de la concentraciones fijadas del producto problema el porcentaje de pérdida y, por lo tanto, la cuantía de la lesión provocada a las uniones intercelulares herméticas. A continuación se calcula la $FL_{20}$ (es decir, la concentración que provoca un 20 % de pérdida de fluoresceína teniendo en cuenta los valores registrados con la monocapa confluente sin tratar y con los elementos insertados sin células). El valor de $FL_{20}$ (mg/ml) se utiliza en el modelo de predicción para identificar los agentes corrosivos e irritantes intensos para los ojos (véase el punto 35).

La recuperación es una parte importante del perfil de toxicidad de un producto problema que se evalúa también con el ensayo de irritación ocular *in vivo*. Los análisis preliminares indican que los datos de recuperación (hasta 72 h después de la exposición al producto) podrían incrementar la capacidad predictiva del Protocolo n.º 71 de INVITTOX, pero es necesario proseguir la evaluación, que mejoraría con más datos, adquiridos preferentemente mediante nuevos ensayos (6). El presente método de ensayo se actualizará en consecuencia a la luz de la nueva información y los datos que se vayan considerando.

PROCEDIMIENTO

**Preparación de la monocapa celular**

La monocapa de células MDCK CB997 se elabora utilizando células subconfluentes cultivadas en matraces de cultivo celular con medio DMEM/Nutrient Mix F12 (1x concentrado con L-glutamina, HEPES 15 mM, calcio (a una concentración de 1,0-1,8 mM) y un 10 % de FCS/FBS inactivado por calor). Es muy importante que todos los medios/soluciones utilizados a lo largo del ensayo FL contengan calcio a una concentración entre 1,8 mM (200 mg/l) y 1,0 mM (111 mg/l) para asegurar la formación e integridad de las uniones intercelulares herméticas. Debe controlarse la banda del número de pases celulares para que la formación de uniones intercelulares herméticas sea homogénea y reproducible. Las células debe estar preferentemente en la banda de 3-30 pases desde la descongelación, ya que las células en esta banda de pases tienen funciones similares, lo que contribuye a la reproducibilidad de los resultados del ensayo.

Antes de aplicar el método de ensayo FL, las células se desprenden del matraz por tripsinización y se centrifugan, y un número adecuado de células se siembra en los elementos insertados colocados en placas de 24 pocillos (véase el apéndice 1). Para sembrar las células deben usarse elementos insertados de 12 mm de diámetro, con membrana de mezcla de ésteres de celulosa, un espesor de 80 a 150 µm y un tamaño de poro de 0,45 µm. En el estudio de validación se utilizaron elementos insertados de 12 mm Millicell-HA. Las propiedades del elemento insertado y el tipo de membrana son importantes, puesto que pueden afectar al crecimiento celular y a la unión de los productos. Algunos tipos de productos pueden unirse a la membrana Millicell-HA, lo que puede afectar a la interpretación de los resultados. Si se utilizan otras membranas, para demostrar su equivalencia deben utilizarse productos de la prueba de la competencia (véase el apéndice 3).

▼M7

La unión del producto a la membrana del elemento insertado es más común en caso de productos catiónicos, como el cloruro de benzalconio, que son atraídos por la membrana cargada (7). La unión del producto a la membrana del elemento insertado puede aumentar el período de exposición al producto, dando lugar a una sobreestimación del potencial tóxico del producto, pero también puede reducir físicamente la pérdida de fluoresceína a través del elemento insertado por unión del colorante al producto catiónico unido a la membrana del elemento insertado, dando lugar a una subestimación del potencial tóxico del producto. Esto puede verificarse fácilmente exponiendo la membrana sola a la concentración máxima del producto problema y añadiendo a continuación el colorante fluoresceína sódica a la concentración normal durante el tiempo establecido (testigo sin células). Si se produce unión del colorante de fluoresceína, la membrana del elemento insertado se verá amarilla después de que el producto problema se haya lavado. Por lo tanto, es esencial conocer las propiedades de unión del producto problema para poder interpretar los efectos de este sobre las células.

La siembra de las células sobre los elementos insertados debe producir una monocapa confluente en el momento de la exposición al producto. Deben añadirse 1,6 x $10^5$ células por elemento insertado (400 µl de una suspensión celular con una densidad de 4 x $10^5$ células/ml). En estas condiciones, se obtiene una monocapa confluente por lo general al cabo de 96 horas de cultivo. Los elementos insertados deben examinarse visualmente antes de la siembra, con objeto de garantizar que los eventuales daños obervados en el control visual descrito en el punto 30 se deben a la manipulación.

Los cultivos de células MDCK deben mantenerse en incubadores con atmósfera humidificada, con un 5 % ± 1 % de $CO_2$ y a 37 °C ± 1 °C. Las células deben estar exentas de contaminación por bacterias, virus, micoplasmas y hongos.

**Aplicación de los productos problema y testigo**

Para cada tanda experimental debe prepararse una nueva solución madre de producto problema, la cual se ha de utilizar en el plazo de 30 minutos a partir de su preparación. Los productos problema deben prepararse en HBSS sin rojo de fenol, con calcio (a una concentración de 1,0-1,8 mM), para evitar la unión a las proteínas plasmáticas. Antes del ensayo debe evaluarse la solubilidad del producto a 250 mg/ml en HBSS. Si a esta concentración el producto forma una suspensión o emulsión estable (es decir, mantiene la uniformidad y no sedimenta ni se separa en más de una fase) durante 30 minutos, la HBSS puede utilizarse como disolvente. Sin embargo, si se observa que el producto es insoluble en HBSS a esta concentración, debe considerarse el uso de otros métodos de ensayo en lugar del método FL. El uso de aceite de vaselina fluido como disolvente, en los casos en que se vea que el producto es insoluble en HBSS, debe considerarse con cautela, ya que no se dispone de suficientes datos para llegar a una conclusión sobre el comportamiento del ensayo FL en tales condiciones.

Todos los productos problema se preparan en HBSS sin rojo de fenol, con calcio (a una concentración de 1,0-1,8 mM), a partir de la solución madre, diluida a cinco concentraciones fijas, expresadas en peso por volumen: 1, 25, 100, 250 mg/ml y una forma sin diluir o una solución saturada. Al someter a ensayo un producto sólido, debe incluirse una concentración muy alta, de 750 mg/ml. Esta concentración de producto puede tener que aplicarse a las células utilizando una pipeta de desplazamiento positivo. Si se observa que la toxicidad está entre 25 y 100 mg/ml, se someten a ensayo en dos tandas las siguientes concentraciones adicionales: 1, 25, 50, 75, 100 mg/ml. De estas concentraciones debe derivarse el valor de $FL_{20}$ siempre que se cumplan los criterios de aceptación.

Los productos problema se aplican a las monocapas de células confluentes después de retirar el medio de cultivo celular y de lavar dos veces con HBSS sin rojo de fenol, con calcio (a una concentración de 1,0-1,8 mM), estéril y caliente (37 °C). Previamente, los filtros se habrán comprobado visualmente para detectar los eventuales daños preexistentes que pudieran atribuirse erróneamente a posibles incompatibilidades con los productos problema. Deben utilizarse al menos tres réplicas para cada concentración del producto problema y para los testigos en cada tanda. Después de 1 minuto de exposición a temperatura ambiente, el

▼M7

producto problema debe retirarse cuidadosamente por aspiración, la monocapa debe lavarse dos veces con HBSS sin rojo de fenol, con calcio (a una concentración de 1,0-1,8 mM), estéril y caliente (37 °C), y la pérdida de fluoresceína debe medirse de forma inmediata.

En cada tanda deben utilizarse testigos negativos (TN) y positivos (TP) en paralelo para demostrar que la integridad de la monocapa (TN) y la sensibilidad de las células (TP) se encuentran dentro de una gama de aceptación definida históricamente. El producto sugerido como TP es Brij 35 (n.º CAS 9002-92-0) a 100 mg/ml. Esta concentración debe dar aproximadamente un 30 % de pérdida de fluoresceína (intervalo aceptable: 20-40 % de pérdida de fluoresceína, sinónimo de lesión de la capa celular). El producto sugerido como TN es HBSS sin rojo de fenol, con calcio (a una concentración de 1,0-1,8 mM) (testigo en blanco, sin tratar). En cada tanda debe incluirse también un testigo de pérdida máxima para poder calcular los valores de $FL_{20}$. La pérdida máxima se determina utilizando un elemento insertado testigo sin células.

**Determinación de la permeabilidad a la fluoresceína**

Inmediatamente después de la eliminación de los productos problema y testigo, se añaden a los elementos insertados (p. ej., Milicell-HA) 400 µl de solución de fluoresceína sódica de 0,1 mg/ml [0,01 % (p/v) en HBSS sin rojo de fenol, con calcio (a una concentración de 1,0-1,8 mM)]. Los cultivos se mantienen durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al final de la incubación con fluoresceína, los elementos insertados se retiran cuidadosamente de cada pocillo. Se efectúa una comprobación visual de cada filtro y se registran los eventuales daños que se hayan producido durante la manipulación.

La cantidad de fluoresceína que haya pasado a través de la monocapa y del elemento insertado se cuantifica en la solución que haya permanecido en los pocillos después de la retirada de los elementos insertados. Las mediciones se realizan en un espectrofluorímetro a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 485 nm y 530 nm, respectivamente. La sensibilidad del espectrofluorímetro debe fijarse de manera que exista la mayor diferencia numérica entre la pérdida máxima de fluoresceína (elemento insertado sin células) y la pérdida mínima de fluoresceína (elemento insertado con monocapa confluente, tratado con el TN). Habida cuenta de las diferencias en el espectrofluorímetro utilizado, se sugiere utilizar una sensibilidad que dé una intensidad de fluorescencia > 4 000 en el testigo de pérdida máxima de fluoresceína. El valor correspondiente a la pérdida máxima de fluoresceína no debe ser superior a 9 999. La intensidad de la fluorescencia correspondiente a la pérdida máxima debe estar dentro del intervalo lineal del espectrofluorímetro utilizado.

**Interpretación de los resultados y modelo de predicción**

La cantidad de la pérdida de fluoresceína es proporcional a las lesiones inducidas por el producto en las uniones intercelulares herméticas. El porcentaje de pérdida de fluoresceína a cada concentración estudiada de producto problema se calcula a partir de la valores de pérdida de fluoresceína obtenidos con el producto problema haciendo referencia a los valores de pérdida de fluoresceína del TN (lectura de la monocapa confluente de células tratadas con el TN) y un testigo de pérdida máxima (lectura correspondiente a la cantidad de fluoresceína perdida a través de un elemento insertado sin células).

La intensidad media de la fluorescencia correspondiente a la pérdida máxima = x

La intensidad media de la fluorescencia correspondiente a la pérdida 0 % (TN) = y

La intensidad media correspondiente a la pérdida del 100 % se obtiene restando, de la intensidad media correspondiente a la pérdida máxima, la intensidad media correspondiente a la pérdida del 0 %,

es decir, $x - y = z$

El porcentaje de pérdida a cada dosis fijada se obtiene restando el valor correspondiente a la pérdida del 0 % de la intensidad de la fluorescencia media de las lecturas de las tres réplicas (m) y dividiendo este valor por el correspondiente a la pérdida del 100 %, es decir, $\% FL = [(m - y) / z] \times 100\ \%$, donde:

▼M7

M = intensidad de fluorescencia media de las mediciones de las tres réplicas de la concentración correspondiente

% FL = porcentaje de fluoresceína que se pierde a través de la capa celular

Debe aplicarse la siguiente ecuación para el cálculo de la concentración del producto que provoca una FL del 20 %:

$$FL_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

donde:

D = % de inhibición

A = % lesión (pérdida de fluoresceína del 20 %)

B = % de pérdida de fluoresceína < A

C = % de pérdida de fluoresceína > A

$M_C$ = concentración (mg/ml) de C

$M_B$ = concentración (mg/ml) de B

El valor de corte de $FL_{20}$ para la predicción de un producto como agente corrosivo o irritante intenso para los ojos se indica a continuación:

| $FL_{20}$ (mg/ml) | Clas. y eti. del SGA de la ONU | Clas. y eti. del CLP de la UE | Clas. y eti. de la EPA de los EE.UU. |
|---|---|---|---|
| ≤ 100 | Categoría 1 | Categoría 1 | Categoría I |

Clas. y eti.: clasificación y etiquetado

El método de ensayo FL solo se recomienda para la identificación de agentes corrosivos e irritantes intensos para los ojos hidrosolubles (categoría 1 del SGA de la ONU, categoría 1 del CLP de la UE, categoría I de la EPA de los EE.UU.) (véanse los puntos 1 y 10).

Para identificar un producto (sustancia o mezcla) hidrosoluble (3) (6) (7) como «inductor de lesiones oculares graves» (categoría 1 del SGA de la ONU o del CLP de la UE) o como «corrosivo o irritante intenso para los ojos» (categoría I de la EPA de los EE.UU.), el producto problema debe tener un valor de $FL_{20} \leq 100$ mg/ml.

**Aceptación de los resultados**

El valor medio correspondiente a la pérdida máxima de fluoresceína (x) debe ser superior a 4 000 (véase el punto 31), el valor medio correspondiente a la pérdida del 0 % (y) debe ser inferior o igual a 300, y el valor medio correspondiente a la pérdida del 100 % (z) debe estar comprendido entre 3 700 y 6 000.

Se considera que un ensayo es aceptable si el testigo positivo provoca entre un 20 % y un 40 % de lesiones a la capa celular (medida como pérdida porcentual de fluoresceína).

DATOS E INFORME

**Datos**

De cada tanda deben indicarse en forma tabular los datos obtenidos con cada uno de los pocillos replicados (por ejemplo, valores de la intensidad de la fluorescencia y datos calculados de porcentaje de FL para cada producto problema, incluida la clasificación). Además, deben comunicarse las medias ± desviación típica de las mediciones de las distintas réplicas de cada tanda.

▼M7

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Productos problema y testigo*

— Denominación o denominaciones químicas, como la denominación estructural utilizada por el Chemical Abstracts Service (CAS), seguida por otras denominaciones, si se conocen;

— Número CAS del producto, si se conoce;

— Pureza y composición de la sustancia o mezcla (en porcentajes en peso), en la medida en que se disponga de esta información;

— Propiedades físico-químicas pertinentes para la realización del estudio (por ejemplo, estado físico, volatilidad, pH, estabilidad, hidrosolubilidad, clase química);

— Tratamiento de los productos problema y testigo antes del ensayo, en su caso (por ejemplo, calentamiento, trituración);

— Condiciones de almacenamiento.

*Justificación del método de ensayo y del protocolo utilizados*

— Deben incluirse consideraciones en cuanto al ámbito de aplicación y las limitaciones del método de ensayo.

*Condiciones del ensayo*

— Descripción del sistema celular utilizado, incluidos el certificado de autenticidad y la situación de la línea celular en cuanto a los micoplasmas;

— Particularidades del procedimiento de ensayo empleado;

— Concentración o concentraciones utilizadas del producto problema;

— Duración de la exposición al producto problema;

— Duración de la incubación con fluoresceína;

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;

— Descripción de los criterios de evaluación seguidos;

— Referencia a datos anteriores del modelo (por ejemplo, testigos negativos y positivos, productos de referencia, si procede);

— Información sobre la competencia técnica demostrada por el laboratorio.

*Resultados*

— Cuadro de datos de los distintos productos problema y testigo correspondientes a cada tanda y a las mediciones de cada réplica (incluidos los resultados individuales, las medias y las desviaciones típicas);

— Clasificación o clasificaciones derivadas con referencia al modelo de predicción y/o a los criterios de decisión utilizados;

— Descripción de otros efectos observados.

▼**M7**

*Discusión de los resultados*

— Deben incluirse consideraciones sobre los resultados no concluyentes (punto 35: $FL_{20}$ > 100 mg/ml) y ensayos adicionales.

*Conclusiones*

BIBLIOGRAFÍA

(1) Naciones Unidas (2009), Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), tercera edición revisada, Nueva York y Ginebra. Publicaciones de las Naciones Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible en: [http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_s.html]

(2) U.S. EPA (1996), Label Review Manual: 2nd Edition, EPA737-B-96-001, Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency.

(3) CEVMA de la Comisión Europea (2009), Statement on the scientific validity of cytotoxicity/cell-function based *in vitro* assays for eye irritation testing.

(4) Scott, L. *et al.* (2010), A proposed eye irritation testing strategy to reduce and replace *in vivo* studies using Bottom-Up and Top-Down approaches, *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9

(5) Capítulo B.5 del presente anexo, *Irritación/corrosión ocular aguda.*

(6) CEVMA de la Comisión Europea (1999), INVITOX Protocol 71: Fluorescein Leakage Test, Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). Available at: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu

(7) CEVMA de la Comisión Europea (2008), Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing.

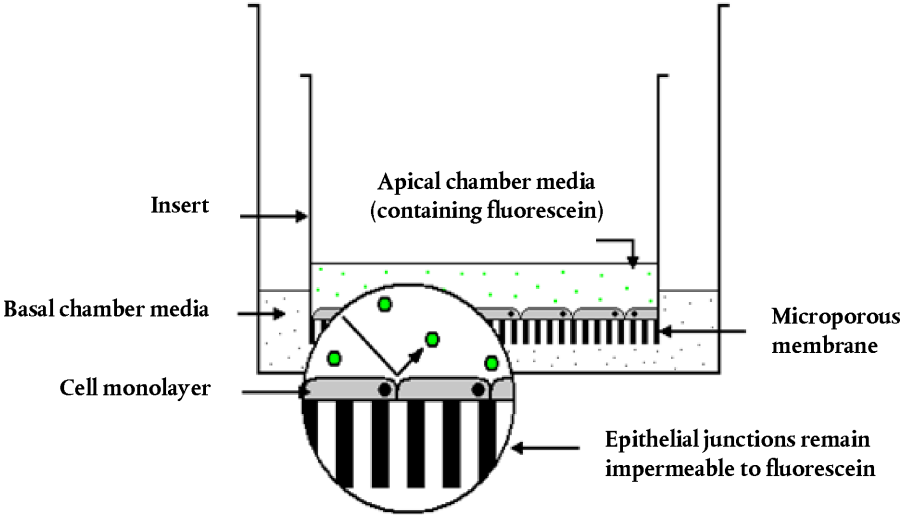
(8) OCDE (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, OECD Series on Testing and Assessment No. 34. OECD, Paris.

▼M7

*Apéndice 1*

**DIAGRAMA DE CÉLULAS MDCK CULTIVADAS SOBRE LA MEMBRANA DE UN ELEMENTO INSERTADO PARA EL MÉTODO DE ENSAYO FL**

Se cultiva una capa confluente de células MDCK en la membrana semipermeable de un elemento insertado. Los elementos insertados se ponen en los pocillos de placas de 24 pocillos.




La figura procede de: Wilkinson, P.J. (2006), Development of an *in vitro* model to investigate repeat ocular exposure, Ph.D. Thesis, University of Nottingham, UK.

▼M7

*Apéndice 2*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su» pertinencia«. Este término y el de» concordancia «se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Categoría I de la EPA**: Productos que producen corrosión (destrucción irreversible del tejido ocular) o afectación o irritación de la córnea, persistente durante más de 21 días (2).

**CLP de la UE**: (Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas): Aplica en la Unión Europea (UE) el sistema SGA de la ONU para la clasificación de los productos (sustancias y mezclas).

**Tasa de falsos negativos**: Proporción de todos los productos positivos identificados erróneamente como negativos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Tasa de falsos positivos**: Proporción de todos los productos negativos identificados erróneamente como positivos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**$FL_{20}$**: Puede estimarse mediante la determinación de la concentración a la que el producto problema hace que el 20 % de la fluoresceína pase a través de la capa celular.

**Pérdida de fluoresceína**: Cantidad de fluoresceína que pasa a través de la capa celular, medida por espectrofluorometría.

**SGA [(Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (ONU)]**: Sistema que propone la clasificación de productos químicos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros fisicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente.

**Categoría 1 del SGA**: Producción de una lesión tisular en el ojo o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación.

**Peligro**: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**Mezcla**: Término utilizado en el contexto de la SGA de la ONU como mezcla o solución compuesta por dos o más sustancias que no reaccionan en ella.

**Testigo negativo**: Muestra replicada no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo para determinar si el disolvente interactúa con el sistema de ensayo.

▼M7

**Sin clasificar**: Productos que no están clasificados como irritantes oculares en las categorías 1, 2A o 2B del SGA de la ONU; categorías 1 o 2 del CLP de la UE; o categorías I, II o III de la EPA de los EE.UU.

**Agentes corrosivos para los ojos**: a) Productos que provocan una lesión tisular irreversible en los ojos; b) Productos clasificados como irritantes para los ojos en la categoría 1 del SGA de la ONU; categoría 1 del CLP de la UE; o categoría I de la EPA de los EE.UU.

**Agentes irritantes para los ojos**: a) Productos que producen un cambio reversible en el ojo como consecuencia de su aplicación a la superficie anterior de este; b) Productos clasificados como irritantes para los ojos en las categorías 2A o 2B del SGA de la ONU; categoría 2 del CLP de la UE; o categorías II o III de la EPA de los EE.UU.

**Agentes irritantes intensos para los ojos**: a) Productos que provocan lesiones tisulares en los ojos como consecuencia de su aplicación en la superficie anterior del ojo, y que no son reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación, o una grave reducción física de la vista; b) Productos clasificados como irritantes para los ojos en la categoría 1 del SGA de la ONU; categoría 1 del CLP de la UE; o categoría I de la EPA de los EE.UU.

**Testigo positivo**: Muestra replicada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con un producto del que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser extrema la magnitud de la respuesta positiva.

**Productos de la prueba de la competencia**: Subconjunto de la lista de productos de referencia que puede ser utilizado por un laboratorio sin experiencia para demostrar su competencia con el método de ensayo de referencia validado.

**Pertinencia**: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (8).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios.

**Ensayo de sustitución**: Ensayo que se diseña para sustituir un ensayo utilizado de forma sistemática y aceptado para la identificación de peligros o la evaluación de riesgos, y del que se ha determinado que proporciona una protección equivalente o mejorada de la salud humana o del medio ambiente, según corresponda, respecto al ensayo aceptado, en relación con todas las situaciones de ensayo y todos los productos posibles.

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (8).

**Lesiones oculares graves**: Producción de una lesión tisular en el ojo o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación.

**Testigo del disolvente/vehículo**: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, incluido el disolvente o vehículo, y que se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con el producto problema y otras muestras testigo a fin de determinar la respuesta de base correspondiente a las

▼M7

muestras tratadas con el producto problema disuelto en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un testigo negativo en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Especificidad**: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo.

**Sustancia**: En el contexto del SGA de la ONU tiene el sentido de elementos químicos y sus compuestos en estado natural o en el estado obtenido por algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para conservar su estabilidad y las impurezas resultantes del proceso utilizado, con exclusión de cualquier disolvente que pueda separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni cambiar su composición.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Estrategia de ensayos escalonados**: Estrategia de ensayo por fases, en la que se revisa toda la información existente sobre un producto problema, siguiendo un orden especificado, en un proceso de ponderación de las pruebas en cada escalón, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar al escalón siguiente. Si puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, no hace falta efectuar más ensayos. Si no puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, se aplica un procedimiento secuencial de ensayos con animales por fases hasta que pueda efectuarse una clasificación inequívoca.

**Método de ensayo validado**: Método de ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (8).

**Ponderación de las pruebas**: Proceso de consideración de los aspectos favorables y desfavorables de los distintos elementos de información a efectos de alcanzar y confirmar una conclusión en cuanto al peligro potencial de un producto.

▼M7

*Apéndice 3*

**PRODUCTOS UTILIZADOS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA CON EL MÉTODO DE ENSAYO FL**

Antes de proceder al uso sistemático de este método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, identificando correctamente la clasificación de los ocho productos recomendados del cuadro 1 en cuanto a su corrosividad ocular. Estos productos se seleccionaron para representar la gama de respuestas en cuanto a la irritación/corrosión local de los ojos, sobre la base de los resultados del ensayo *in vivo* con ojo de conejo [TG 405, método B.5 (5)] (es decir, categorías 1, 2A, 2B, o sin clasificar según el SGA de la ONU). Sin embargo, considerando la utilidad validada del ensayo FL (es decir, identificar solamente agentes corrosivos/ irritantes intensos para los ojos), solo hay dos resultados del ensayo a efectos de clasificación (agente corrosivo/ irritante intenso o agente no corrosivo / no irritante intenso) para demostrar la competencia con el método. Otros criterios de selección fueron el que los productos estuvieran disponibles en el mercado, que tuvieran datos de referencia *in vivo* de alta calidad y también datos de alta calidad obtenidos con el método de ensayo FL. Por esta razón, los productos de la prueba de competencia se seleccionaron a partir del documento» Fluorescein Leakage Assay Background Review Document as an Alternative Method for Eye Irritation Testing «(8), utilizado para la validación retrospectiva del método de ensayo FL.

*Cuadro 1:*

**Productos recomendados para demostrar la competencia técnica con el método FL**

| Producto | CAS NR | Clase química (1) | Estado físico | Clasificación *in vivo* (2) | Clasificación *in vitro* (3) |
|---|---|---|---|---|---|
| Cloruro de benzalconio (5 %) | 8001-54-5 | Compuesto onio | Líquido | Categoría 1 | Corrosivo/ irritante intenso |
| Clorhidrato de prometazina | 58-33-3 | Amina/amidina, heterociclo, compuesto orgánico de azufre | Sólido | Categoría 1 | Corrosivo/ irritante intenso |
| Hidróxido de sodio (10 %) | 1310-73-2 | Álcali | Líquido | Categoría 1 | Corrosivo/ irritante intenso |
| Laurilsulfato de sodio (15 %) | 151-21-3 | Ácido carboxílico (sal) | Líquido | Categoría 1 | Corrosivo/ irritante intenso |
| 4-Carboxi-benzaldehído | 619-66-9 | Ácido carboxílico, aldehído | Sólido | Categoría 2(A) | No corrosivo / no irritante intenso |
| Nitrato de amonio | 6484-52-2 | Sal inorgánica | Sólido | Categoría 2(A) | No corrosivo / no irritante intenso |
| 2-Metil-acetoacetato de etilo | 609-14-3 | Cetona, éster | Líquido | Categoría 2(B) | No corrosivo / no irritante intenso |
| Glicerol | 56-81-5 | Alcohol | Líquido | Sin categoría | No corrosivo / no irritante intenso |

Abreviaturas: CAS NR = número de registro del «Chemical Abstracts Service».

(1) Se han asignado clases químicas a cada producto problema utilizando un sistema de clasificación habitual, basado en el sistema de clasificación de materias médicas de la National Library of Medicine (MeSH) (se puede encontrar en la dirección http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (TG 405 de la OCDE, método B.5) y utilizando el SGA de la ONU y el CLP de la UE.

(3) Sobre la base de los resultados obtenidos con FL (Protocolo n.º 71 de INVITTOX (6)).

▼M7

## B.62. **ENSAYO DEL COMETA EN CONDICIONES ALCALINAS CON MAMÍFEROS *IN VIVO***

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) de la OCDE 489 (2016). El ensayo del cometa en condiciones alcalinas (electroforesis en gel de células aisladas) (en lo sucesivo, denominado simplemente el ensayo del cometa) se utiliza para la detección de roturas de cadenas de ADN en células o núcleos aislados de múltiples tejidos de animales (por lo general, roedores), que se han visto expuestos a materiales potencialmente genotóxicos. El ensayo del cometa ha sido revisado por distintos grupos de expertos, que han publicado sus recomendaciones (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10). El presente método forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. Se ha elaborado un documento de la OCDE que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a dichas directrices de ensayo (11).

La finalidad del ensayo del cometa es identificar los productos que causan lesiones del ADN. En condiciones alcalinas (pH > 13), el ensayo del cometa puede detectar roturas de cadenas sencillas y dobles que son resultado, por ejemplo, de interacciones directas con secuencias de ADN lábiles en condiciones alcalinas, o como consecuencia de roturas fugaces de cadenas de ADN resultantes de la reparación del ADN por excisión. Estas roturas de cadenas pueden repararse, con lo que no tendrán efecto persistente, pueden ser letales para las células, o pueden fijarse en una mutación que provoque un cambio viable permanente. También pueden dar lugar a lesiones cromosómicas asociadas con numerosas enfermedades humanas, como el cáncer.

En 2006-2012 se llevó a cabo un estudio de validación oficial del ensayo del cometa con roedores *in vivo*, coordinado por el Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM), en colaboración con el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (CEVMA), el Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) y el Centro Interagencias del NTP para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos (NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) (12). Este método de ensayo incluye el uso recomendado y las limitaciones del ensayo del cometa, y se basa en el protocolo final (12) utilizado en el estudio de validación, y en datos adicionales pertinentes tanto publicados como no publicados (propiedad de los laboratorios).

Las definiciones de los términos clave figuran en el apéndice 1. Cabe señalar que pueden utilizarse para este ensayo muchos soportes diferentes (portaobjetos para microscopio, manchas en gel, placas de 96 pocillos, etc.). Por razones prácticas, se emplea en el resto de este documento el término «portaobjetos», pero abarca todos los demás soportes.

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

El ensayo del cometa es un método para medir las roturas de las cadenas de ADN en células eucarióticas. Con detergente y una elevada concentración de sales, se lisan células o núcleos aislados incorporados en gel de agarosa en un portaobjetos. Esta fase de lisis celular digiere las membranas nucleares y celulares y permite la liberación de bucles helicoidales de ADN, denominados generalmente nucleoides y fragmentos de ADN. La electroforesis a pH elevado resulta en estructuras parecidas a los cometas, que, mediante las adecuadas tinciones fluorescentes, pueden observarse mediante microscopia de fluorescencia; los fragmentos de ADN migran desde la «cabeza» a la «cola» en función de su tamaño, y la intensidad de la cola del cometa respecto a la intensidad total (cabeza y cola) refleja la proporción de la rotura del ADN (13) (14) (15).

El ensayo del cometa en condiciones alcalinas *in vivo* está especialmente indicado para evaluar el peligro genotóxico porque las respuestas del ensayo dependen del ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) *in vivo*, y también de los procesos de reparación del ADN. Estos pueden variar según la especie, el tejido y el tipo de lesiones del ADN.

▼M7

Para cumplir los requisitos de bienestar animal, en particular la reducción del uso de animales (principio de las tres eres: reemplazar, reducir y refinar), es posible también integrar este ensayo con otros estudios toxicológicos, como los de toxicidad por administración continuada (10) (16) (17), o combinar su criterio de valoración con otros criterios de genotoxicidad, como el del ensayo de micronúcleos en eritrocitos de mamíferos *in vivo* (18) (19) (20). El ensayo del cometa se realiza en la mayoría de los casos con roedores, aunque se ha aplicado a otras especies de mamíferos y de animales no mamíferos. El uso de especies distintas de los roedores debe justificarse desde el punto de vista científico y ético en cada caso, y se recomienda vivamente que el ensayo del cometa se realice con especies distintas de los roedores solo como parte de otro estudio de toxicidad y no como ensayo independiente.

La vía de exposición y el tejido o tejidos objeto de estudio deben elegirse en función de todos los datos disponibles/existentes sobre los productos problema, tales como la vía prevista o posible de exposición humana, el metabolismo y distribución; la posibilidad de efectos en el punto de contacto, las alertas estructurales, otros datos de toxicidad y genotoxicidad, y el objeto del estudio. Por lo tanto, en su caso, el potencial genotóxico de los productos problema podrá analizarse en el tejido o tejidos diana de los efectos carcinogénicos y/u otros efectos tóxicos. El ensayo también se considera útil para ahondar en el estudio de la genotoxicidad detectada por un sistema *in vitro*. Es adecuado realizar un ensayo del cometa *in vivo* en un tejido de interés cuando se pueda esperar razonablemente que este tejido estará convenientemente expuesto.

El ensayo se ha validado más ampliamente en tejidos somáticos de ratas machos en estudios colaborativos como el estudio del JaCVAM (12) y en Rothfuss *et al.*, 2010 (10). En el estudio de validación internacional del JaCVAM se utilizaron el hígado y el estómago: el hígado, porque es el órgano más activo en el metabolismo de los productos y también con frecuencia un órgano diana de la carcinogenicidad; el estómago, porque normalmente es el primer punto de contacto con los productos tras la exposición oral, aunque también deben considerarse tejidos del punto de contacto otras zonas del tubo gastrointestinal como el duodeno y el yeyuno, las cuales podrían considerarse más pertinentes para la exposición humana que el estómago glandular de los roedores. Debe velarse por que estos tejidos no se expongan a concentraciones excesivamente elevadas del producto problema (21). La técnica es aplicable, en principio, a cualquier tejido del que puedan obtenerse suspensiones de núcleos o células aisladas analizables. Ciertos datos propiedad de varios laboratorios demuestran el éxito de su aplicación a muchos tejidos diferentes, y existen muchas publicaciones que muestran la aplicabilidad de la técnica a órganos o tejidos distintos de, por ejemplo, hígado y estómago, como el yeyuno (22), el riñón (23) (24), la piel (25) (26), o la vejiga urinaria (27) (28), los pulmones y las células del lavado broncoalveolar (pertinentes para estudios de productos inhalados) (29) (30), y también se han realizado ensayos en múltiples órganos (31) (32).

Si bien puede haber interés por determinar los efectos genotóxicos en células germinales, debe señalarse que el ensayo del cometa normal en condiciones alcalinas, tal como se describe en el presente método de ensayo, no se considera adecuado para medir las roturas de las cadenas de ADN en las células germinales maduras. Dado que en un estudio bibliográfico sobre la utilización del ensayo del cometa sobre la genotoxicidad en células germinales se señalaron unos niveles de fondo elevados y variables de las lesiones del ADN (33), se considera necesario aportar modificaciones a los protocolos y mejorar la normalización y los estudios de validación antes de que pueda incluirse en el método de ensayo el ensayo del cometa con células germinales (por ejemplo, esperma). Por otra parte, la pauta de exposición recomendada descrita en el presente método de ensayo no es la óptima y puede ser necesario aplicar otros tiempos más largos de exposición o de muestreo para un análisis significativo de las roturas de las cadenas de ADN en el esperma maduro. En la bibliografía se han descrito efectos genotóxicos, medidos por el ensayo del cometa en células testiculares en diferentes etapas de la diferenciación (34) (35). No obstante, cabe señalar que las gónadas contienen una mezcla de células somáticas y germinales. Por ello, unos resultados positivos en las gónadas completas (testículos) no reflejan necesariamente las lesiones causada en las células germinales; sin embargo, indican que el producto o productos problema o sus metabolitos han alcanzado las gónadas.

▼M7

El entrecruzamiento no puede detectarse de manera fiable en las condiciones experimentales normales del ensayo del cometa. En determinadas condiciones experimentales modificadas podrían detectarse los enlaces cruzados ADN-ADN y ADN-proteína, y otras modificaciones de las bases, como su oxidación (23) (36) (37) (38) (39). Pero sería necesario seguir trabajando para caracterizar adecuadamente las necesarias modificaciones del protocolo. Así pues, la detección de los agentes de entrecruzamiento no es el objetivo principal del ensayo que se describe aquí. El ensayo no es adecuado, ni siquiera con modificaciones, para detectar anéugenos.

Debido al estado actual de los conocimientos, el ensayo del cometa *in vivo* tiene asociadas varias limitaciones adicionales (véase el apéndice 3). Se espera que el método de ensayo se revise en el futuro y, en caso necesario, se modifique a la luz de la experiencia adquirida.

Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines reglamentarios, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la reglamentación impone el ensayo de la mezcla.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se exponen los animales al producto problema por una vía adecuada. Una descripción detallada de la administración y del muestreo figura en los puntos 36-40. En el momento o momentos de muestreo seleccionados, se extraen los tejidos de interés y se preparan suspensiones de células/núcleos aislados (puede realizarse perfusión *in situ* cuando se considere útil, por ejemplo en el hígado), que se incorporan a agar blando para inmovilizarlas en portaobjetos. Las células/núcleos se tratan con solución amortiguadora de lisis para eliminar las membranas celulares y/o nucleares, y se exponen a bases fuertes, por ejemplo a pH $\geq$ 13, a fin de permitir que se desenrolle el ADN y se liberen los bucles y fragmentos de ADN relajado. El ADN nuclear presente en el agar se somete entonces a electroforesis. Las moléculas de ADN no fragmentado normal permanecen en la posición en la que se encontraba el ADN nuclear en el agar, al tiempo que los eventuales bucles de ADN fragmentado y ADN relajado migran hacia el ánodo. Tras la electroforesis, el ADN se visualiza utilizando una tinción fluorescente apropiada. Las preparaciones deben analizarse utilizando un microscopio y sistemas de análisis de imágenes totalmente automatizados o semiautomatizados. La proporción de ADN que ha migrado durante la electroforesis y la distancia de migración reflejan la cantidad y el tamaño de los fragmentos de ADN. Hay varios criterios de valoración del ensayo del cometa. Para evaluar las lesiones del ADN se ha recomendado el ADN contenido en la cola (porcentaje de ADN de la cola o porcentaje de intensidad de la cola) (12) (40) (41) (42). Tras el análisis de un número suficiente de núcleos, los datos se analizan con métodos adecuados para evaluar los resultados del ensayo.

Debe tenerse en cuenta que se ha investigado la modificación de varios aspectos de la metodología, con inclusión de la preparación de las muestras, las condiciones de la electroforesis, los parámetros del análisis visual (por ejemplo, intensidad de la tinción, intensidad de la luz de la bombilla del microscopio, y utilización de filtros de microscopio y ajustes de la cámara) y las condiciones ambientales (p. ej., iluminación de fondo), que pueden afectar a la migración del ADN (43) (44) (45) (46).

VERIFICACIÓN DE LA COMPETENCIA DEL LABORATORIO

Cada laboratorio debe establecer su competencia experimental con el ensayo del cometa demostrando su capacidad para obtener suspensiones de células o núcleos aislados de calidad suficiente con cada tejido diana de cada una de las especies utilizadas. La calidad de las preparaciones se evaluará en primer lugar observando si el porcentaje de ADN de la cola de animales tratados con un vehículo está en un intervalo bajo y reproducible. Los datos actuales sugieren que la media del grupo del porcentaje de ADN de la cola (sobre la base de la media de las medianas — véanse en el punto 57 detalles de estos términos) en hígado de rata no debe superar preferentemente el 6 %, lo que sería compatible con los valores del estudio de validación del JaCVAM (12) y con otros datos publicados y

▼M7

protegidos. No hay suficientes datos por el momento para hacer recomendaciones sobre intervalos óptimos o aceptables para otros tejidos. Esto no excluye la utilización de otros tejidos, cuando esté justificado. El informe del ensayo debe proporcionar un análisis adecuado del comportamiento del ensayo del cometa con estos tejidos en relación con la bibliografía publicada o con datos protegidos. En primer lugar, es deseable que un intervalo bajo de porcentaje de ADN de cola en los testigos permita un intervalo analítico suficiente para detectar un efecto positivo. En segundo lugar, cada laboratorio debe ser capaz de reproducir las respuestas previstas ante mutágenos directos y promutágenos con distintos modos de acción, tal como se sugiere en el cuadro 1 (punto 29).

Pueden seleccionarse sustancias positivas, por ejemplo a partir del estudio de validación del JaCVAM (12) o de otros datos publicados (véase el punto 9), cuando sea pertinente, con justificación, y que demuestren respuestas positivas claras en los tejidos de interés. También debe demostrarse la capacidad de detectar efectos débiles de mutágenos conocidos, como el EMS a dosis bajas, por ejemplo estableciendo relaciones dosis-respuesta con dosis apropiadas en cuanto a su número y al intervalo entre ellas. Los esfuerzos iniciales deben centrarse en establecer la competencia con los tejidos más utilizados como, por ejemplo, el hígado de roedores, para poder efectuar comparaciones con los datos existentes y los resultados previstos (12). Al mismo tiempo podrían recogerse datos de otros tejidos como, por ejemplo, estómago/duodeno/yeyuno, sangre, etc. El laboratorio debe demostrar su competencia con cada tejido de cada especie que tenga intención de estudiar, y debe demostrar que se puede obtener en ese tejido una respuesta positiva aceptable con un mutágeno conocido (por ejemplo, EMS).

Deben recogerse datos de testigos negativos o del vehículo con el fin de demostrar la reproducibilidad de las respuestas de datos negativos, y de garantizar que los aspectos técnicos del ensayo se controlan adecuadamente o de sugerir la necesidad de volver a establecer los intervalos de los testigos históricos (véase el punto 22).

Conviene señalar que, si bien pueden recogerse en la autopsia y someterse al ensayo del cometa muchos tejidos, el laboratorio tiene que ser competente en la recolección de múltiples tejidos de un solo animal, garantizando así que no se pierde ninguna de las posibles lesiones del ADN y que no se pone en peligro el análisis del cometa. El plazo transcurrido entre la eutanasia y la extracción de los tejidos para su transformación puede ser crítica (véase el punto 44).

Debe considerarse el bienestar de los animales al adquirir la competencia con este ensayo, por lo que pueden utilizarse tejidos de animales utilizados en otros ensayos cuando se esté adquiriendo competencia con los diversos aspectos del ensayo. Por otra parte, podrá no ser necesario realizar un estudio completo durante las fases de establecimiento de un nuevo método de ensayo en un laboratorio y podrán utilizarse menos animales o menos concentraciones de ensayo cuando se estén adquiriendo las capacidades necesarias.

**Datos sobre testigos históricos**

En el transcurso de las investigaciones de competencia, el laboratorio debe crear una base de datos históricos para establecer los intervalos de los testigos positivos y negativos correspondientes y las distribuciones relativas a los tejidos y especies pertinentes. En la bibliografía pueden encontrarse recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (es decir, criterios de inclusión y exclusión de datos en los datos históricos y criterios de aceptabilidad para un determinado experimento) (47). Con otros tejidos y otras especies, así como con otros vehículos y vías de administración, pueden obtenerse valores diferentes de porcentaje de ADN de la cola en el testigo negativo. Por lo tanto, es importante establecer los intervalos de los testigos negativos para cada uno de los tejidos y especies. Los laboratorios deben utilizar métodos de control de calidad, como

▼M7

gráficos de control (por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (48)), con el fin de determinar la variabilidad de sus datos y de demostrar que la metodología está «controlada» en su laboratorio. Es posible que para la detección de los efectos débiles también resulte necesario optimizar la selección de las sustancias adecuadas para servir de testigo positivo, los intervalos de dosis y las condiciones experimentales (por ejemplo, las condiciones de la electroforesis) (véase el punto 17).

Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de su coherencia con las bases de datos de testigos históricos existentes del laboratorio. Cualquier incoherencia importante debería dar lugar a la creación de una nueva base de datos de testigos históricos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparación**

*Selección de la especie animal*

Se utilizan normalmente cepas comunes de laboratorio de roedores adultos jóvenes y sanos (6-10 semanas de edad al inicio del tratamiento, aunque también se pueden aceptar animales ligeramente de más edad). La elección de la especie de roedores debe basarse en: i) las especies utilizadas en otros estudios de toxicidad (para poder relacionar los datos y permitir la integración de los estudios), ii) las especies que hayan formado tumores en un estudio de carcinogenicidad (al investigar el mecanismo de la carcinogénesis), o iii) las especies con el metabolismo más pertinente para los seres humanos, si se conoce. En este ensayo se utilizan habitualmente ratas. No obstante, pueden utilizarse otras especies si se justifica desde el punto de vista científico y ético.

*Condiciones de alojamiento y alimentación de los animales*

Con roedores, la temperatura en el animalario experimental debe ser idealmente de 22 °C (± 3 °C). Lo ideal es que la humedad relativa sea del 50-60 %, con un mínimo del 30 % y un máximo preferentemente del 70 %, salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se pueden utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente del producto problema si se administra por esta vía. Los roedores deben alojarse en grupos pequeños (en general, no más de cinco animales juntos) del mismo sexo si no se espera conducta agresiva. Los animales podrán alojarse por separado solo si está justificado científicamente. Debe utilizarse siempre que sea posible un suelo continuo, ya que los suelos de malla pueden provocar lesiones graves (49). Debe proporcionarse enriquecimiento ambiental adecuado.

*Preparación de los animales*

Los animales se reparten al azar entre los lotes tratados y los testigo. Se identifica a los animales de forma unívoca y se acostumbran a las condiciones del laboratorio durante al menos cinco días antes del inicio del tratamiento. Debe utilizarse el método menos invasivo para la identificación unívoca de los animales. Entre los métodos adecuados figuran el anillamiento, el marcado, la implantación de un microchip y la identificación biométrica. El grapado a las orejas o los dedos no está justificados científicamente en estos ensayos. Las jaulas deben disponerse de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. La variación del peso de los animales al empezar el estudio ha de ser mínima y no debe exceder del ± 20 %.

*Preparación de las dosis*

Los productos problema sólidos deben disolverse o suspenderse en vehículos adecuados, o mezclarse con la dieta o con el agua de bebida, antes de su administración a los animales. Los productos problema líquidos pueden administrarse directamente o diluirse antes de la administración. En lo que respecta a la exposición por inhalación, los productos problema pueden administrarse en forma de gas, de vapor o de aerosol sólido o líquido, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas (50) (51).

Deben utilizarse preparaciones recientes del producto problema, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación y definan las condiciones adecuadas de esta.

▼M7

**Condiciones del ensayo**

*Vehículo*

El vehículo no debe producir efectos tóxicos a los volúmenes de dosis empleados, y no debe haber ninguna sospecha de que reaccione químicamente con los productos problema. Si se emplean vehículos poco conocidos, su inclusión debe estar avalada por información de referencia que indique su compatibilidad en cuanto a los animales de ensayo, la vía de administración y el criterio de valoración. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente o vehículo acuoso. Cabe señalar que algunos de los vehículos (sobre todo los vehículos viscosos) pueden provocar inflamación y aumento de los niveles de base de las roturas de las cadenas de ADN en el punto de contacto, en particular en caso de administración múltiple.

**Testigos**

*Testigos positivos*

En este momento se considera en principio que debe incluirse en cada ensayo un grupo formado por al menos tres animales analizables de un mismo sexo, o de cada sexo si se utilizan ambos (véase el punto 32), tratados con una sustancia testigo positivo. En el futuro podrá ser posible demostrar que se tiene la competencia adecuada y reducir la necesidad de testigos positivos. Si se utilizan múltiples momentos de muestreo (por ejemplo, con un protocolo de una única administración) solo es necesario incluir testigos positivos en uno de los tiempos de muestreo, pero debe garantizarse un diseño equilibrado (véase el punto 48). No es preciso administrar sustancias testigo positivo en paralelo por la misma vía que el producto problema, aunque es importante utilizar la misma vía cuando se miden los efectos en el punto de contacto. Debe demostrarse que las sustancias testigo positivo inducen la rotura de las cadenas de ADN en todos los tejidos de interés para el producto problema, y resulta probable que el EMS sea el testigo positivo de elección, dado que provoca la rotura de las cadenas de ADN en todos los tejidos que se han estudiado. Las dosis de las sustancias testigo positivo deben seleccionarse para generar efectos moderados que sirvan para evaluar críticamente el comportamiento y la sensibilidad del ensayo, y podrían basarse en las curvas de dosis-respuesta establecidas por el laboratorio durante la demostración de la competencia. El porcentaje de ADN de la cola de animales testigo positivo en paralelo debe ser coherente con el intervalo preestablecido en el laboratorio para cada tejido y tiempo de muestreo de la especie correspondiente (véase el punto 16). En el cuadro 1 se incluyen ejemplos de sustancias testigo positivo y algunos de sus tejidos diana (en roedores). Se pueden seleccionar sustancias distintas de las que figuran en el cuadro 1, cuando esté justificado científicamente.

*Cuadro 1:*

**Ejemplos de sustancias testigo positivo y algunos de sus tejidos diana**

| Sustancias y CAS RN |
|---|
| Metanosulfonato de etilo (CAS RN 62-50-0) en cualquier tejido |
| Etil-nitrosourea (CAS RN 759-73-9) en hígado y estómago, duodeno o yeyuno |
| Metanosulfonato de metilo (CAS RN 66-27-3) en hígado, estómago, duodeno o yeyuno, pulmón y células del lavado broncoalveolar (BAL), riñón, vejiga urinaria, pulmón, testículo y médula ósea o sangre |
| *N*-Metil-*N*′-nitro-*N*-nitrosoguanidina (CAS RN 70-25-7) en estómago, duodeno o yeyuno |
| 1,2-Dimetilhidrazina 2HCl (CAS RN 306-37-6) en hígado e intestino |
| *N*-Metil-*N*-nitrosourea (CAS RN 684-93-5) en hígado, médula ósea, sangre, riñón, estómago, yeyuno y cerebro. |

▼M7

*Testigos negativos*

Debe incluirse en cada ensayo, respecto a cada tejido y momento de muestreo, un grupo de animales testigo negativo, tratados solo con el vehículo, pero por lo demás sometidos al mismo proceso que los grupos tratados con el producto problema. El porcentaje de ADN de la cola de los animales testigo negativo debe estar dentro del intervalo de fondo preestablecido en el laboratorio para cada tejido y tiempo de muestreo de la especie correspondiente (véase el punto 16). En ausencia de información anterior o publicada sobre testigos que demuestre que no se encuentran efectos nocivos ni genotóxicos inducidos por el vehículo elegido, por el número de administraciones o por la vía de administración, deberán realizarse estudios iniciales antes de llevar a cabo el estudio completo, a fin de establecer que es aceptable el testigo del vehículo.

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

Aunque hay pocos datos sobre hembras para posibilitar la comparación entre sexos en relación con el ensayo del cometa, otras respuestas de genotoxicidad *in vivo* son similares, en general, entre machos y hembras, por lo que la mayor parte de los estudios podrían realizarse con cualquier sexo. Unos datos que demuestren la existencia de diferencias pertinentes entre machos y hembras (como diferencias de toxicidad sistémica, metabolismo, biodisponibilidad, etc., por ejemplo en un estudio de determinación del intervalo) favorecerán la utilización de ambos sexos. En este caso puede ser conveniente realizar un estudio con ambos sexos, por ejemplo como parte de un estudio de toxicidad por administración continuada. Podría ser adecuado utilizar el diseño factorial en caso de que se utilizaran animales de ambos sexos. En el apéndice 2 se recogen detalles sobre cómo analizar los datos utilizando dicho diseño.

El tamaño de los grupos al principio del estudio (y durante la determinación de la competencia) debe establecerse de manera que comprendan un mínimo de cinco animales analizables de un mismo sexo, o de cada sexo si se utilizan ambos, por grupo (menos en el grupo del testigo positivo en paralelo, véase el punto 29). En caso de que la exposición humana a los productos pueda ser específica de un sexo, como sucede con algunos productos farmacéuticos, el ensayo debe realizarse con animales del sexo correspondiente. Como orientación sobre las necesidades máximas típicas de animales, un estudio realizado de acuerdo con los parámetros establecidos en el punto 33 con tres grupos tratados y testigos negativo y positivo en paralelo (cada grupo compuesto por cinco animales de un solo sexo), requeriría entre 25 y 35 animales.

PAUTA DE TRATAMIENTO

Los animales deben recibir tratamientos diarios durante un período de dos o más días (es decir, dos o más administraciones a intervalos de 24 horas, aproximadamente), y deben recogerse muestras una vez a las 2-6 h (o al $T_{max}$) después del último tratamiento (12). Son aceptables las muestras tomadas de pautas de tratamiento ampliadas (por ejemplo, administración diaria durante 28 días). Se ha demostrado el éxito de la combinación del ensayo del cometa con el de micronúcleos en eritrocitos (10) (19). No obstante, es preciso prestar especial atención a la logística necesaria en relación con el muestreo de tejidos para el análisis de cometa junto con los requisitos del muestreo de tejidos para otros tipos de evaluaciones toxicológicas. La recolección a las 24 horas de la última administración, típica de un estudio de toxicidad general, no es adecuada en la mayoría de los casos (véase el punto 40 sobre el tiempo de muestreo). El uso de otras pautas de tratamiento y de muestreo debe justificarse (véase el apéndice 3). Por ejemplo, podría utilizarse un único tratamiento con múltiples muestreos; debe observarse, no obstante, que serán necesarios más animales para un estudio con una única administración debido a la necesidad de múltiples momentos de muestreo, pero en ocasiones esto puede ser preferible, por ejemplo cuando el producto problema induce toxicidad excesiva tras la administración repetida.

▼M7

Independientemente de cómo se realice el ensayo, es aceptable en la medida en que el producto problema dé una respuesta positiva o, en caso de estudio negativo, siempre que se hayan aportado pruebas directas o indirectas de la exposición del tejido o tejidos diana (o de toxicidad para estos), o si se alcanza la dosis límite (véase el punto 36).

Los productos problema también pueden administrarse en dosis divididas (es decir, en dos tratamientos el mismo día separados por no más de 2 o 3 horas) con el fin de facilitar la administración de grandes volúmenes. En estas circunstancias, el tiempo de muestreo debe programarse en función del momento de la última administración (véase el punto 40).

**Dosis**

Si se lleva a cabo un estudio previo de determinación del intervalo porque no se dispone de datos adecuados de otros estudios pertinentes para ayudar en la selección de las dosis, ha de hacerse en el mismo laboratorio, con la misma especie, cepa, sexo y pauta de tratamiento que se vayan a utilizar en el estudio principal, según los planteamientos actuales de la realización de estudios de determinación del intervalo (10). El estudio deberá tratar de determinar la dosis máxima tolerada (DMT), definida como la dosis que induce efectos ligeramente tóxicos con respecto a la duración del período de estudio (por ejemplo, signos clínicos claros, tales como comportamiento o reacciones de tipo anormal, pequeña pérdida de peso corporal o citotoxicidad para el tejido diana), pero sin llegar a provocar la muerte ni signos de dolor, sufrimiento o angustia que hagan necesaria la eutanasia. En caso de producto problema no tóxico, con un período de administración de 14 días o más, la dosis máxima (límite) es de 1 000 mg/kg de peso corporal/día. Si el período de administración es inferior a 14 días, la dosis máxima (límite) será de 2 000 mg/kg de peso corporal/día. Estos límites pueden variar con determinados tipos de productos problema (por ejemplo, productos farmacéuticos de uso humano) a los que se apliquen normativas específicas.

Los productos que presentan saturación de las propiedades toxicocinéticas, o inducen procesos de destoxificación que puedan dar lugar a una disminución de la exposición después de una administración a largo plazo, pueden constituir excepciones en cuanto a los criterios de establecimiento de la dosis y han de evaluarse caso por caso.

Para las versiones del ensayo del cometa sobre toxicidad tanto aguda como subaguda, además de la dosis máxima (DMT, dosis máxima posible, dosis máxima de exposición o dosis límite), debe seleccionarse una secuencia descendente de al menos otras dos dosis espaciadas adecuadamente (de preferencia separadas por menos de 10) para cada tiempo de muestreo a fin de demostrar la relación de las respuestas con la dosis. No obstante, las dosis empleadas también deben abarcar preferentemente el intervalo entre la máxima y una que produzca toxicidad escasa o nula. Si se observa toxicidad para el tejido diana a todas las dosis utilizadas en el ensayo, se recomienda hacer otro estudio a dosis no tóxicas (véanse los puntos 54-55). Los estudios destinados a investigar de forma más completa la forma de la curva dosis-respuesta pueden necesitar más grupos de dosis.

**Administración de las dosis**

A la hora de diseñar el ensayo, debe tenerse en cuenta la vía prevista de exposición humana. Por lo tanto, cuando esté justificado, podrán elegirse vías de exposición como los alimentos, el agua de bebida, la tópica, la subcutánea, la intravenosa, la oral forzada (por sonda), la inhalación, la intratraqueal o la implantación. En cualquier caso, la vía debe elegirse de forma que se garantice una exposición adecuada del tejido o tejidos diana. En general no se recomienda la inyección intraperitoneal, ya que no es una vía de exposición humana típica y

▼M7

pertinente, y solo debe utilizarse con justificación específica (por ejemplo, algunas sustancias testigo positivo, a efectos de investigación, o algunos medicamentos que se administran por vía intraperitoneal). El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez por sonda o por inyección depende del tamaño del animal utilizado. Este volumen no debe superar 1 ml/l00 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegar a 2 ml/l00 g de peso corporal. Debe justificarse el uso de volúmenes superiores (en caso de que lo permita la legislación sobre bienestar animal). Siempre que sea posible, las diferentes dosis deben lograrse ajustando la concentración de la formulación administrada para garantizar un volumen constante en relación con el peso corporal a todas las dosis.

**Momento del muestreo**

El momento del muestreo es una variable crítica, ya que viene determinado por el plazo necesario para que los productos problema alcancen la concentración máxima en el tejido diana y para que se induzcan las roturas de las cadenas de ADN, pero antes de que tales roturas se supriman, reparen o den lugar a la muerte de las células. La persistencia de algunas de las lesiones que dan lugar a la rotura de las cadenas de ADN detectadas por el ensayo del cometa puede ser muy breve, al menos con algunos productos estudiados *in vitro* (52) (53). Por consiguiente, en caso de que se sospeche la existencia de tales lesiones transitorias de ADN, deben tomarse medidas para mitigar su pérdida velando por que los tejidos se muestreen antes de que sea demasiado tarde, quizás antes de los plazos previstos que figuran a continuación. El tiempo o tiempos de muestreo óptimos pueden ser específicos del producto o de la vía, lo que puede dar lugar, por ejemplo, a una exposición tisular rápida cuando la administración se hace por vía intravenosa o por inhalación. En consecuencia, cuando sea posible, los tiempos de muestreo deben determinarse a partir de los datos cinéticos (por ejemplo, el tiempo ($T_{max}$) al que se alcance la concentración plasmática o tisular máxima ($C_{max}$), o al que se alcance el estado de equilibrio en caso de administración múltiple). En ausencia de datos cinéticos, un compromiso adecuado para la medición de la genotoxicidad es tomar las muestras a las 2-6 h después de la última administración en caso de dos o más administraciones, o tanto a las 2-6 horas como a las 16-26 horas tras una administración única, aunque debe velarse por que la autopsia se haga a todos los animales al mismo tiempo desde la última dosis (o desde la dosis única). La información sobre la aparición de efectos tóxicos en los órganos diana (si se dispone de ella) también puede utilizarse para seleccionar los tiempos de muestreo adecuados.

**Observaciones**

Deben hacerse y registrarse observaciones clínicas generales en relación con la salud de los animales al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período de mayor intensidad de los efectos previstos tras la administración (54). Al menos dos veces al día, se debe observar la posible morbilidad y mortalidad de todos los animales. En los estudios a largo plazo, deben pesarse todos los animales al menos una vez por semana y en el momento de la terminación del período del ensayo. El consumo de alimentos debe medirse a cada cambio de alimentos y al menos una vez por semana. Si el producto problema se administra con el agua de bebida, debe medirse el consumo de agua cada vez que se cambie el agua y al menos una vez por semana. Los animales que presenten indicadores de toxicidad excesiva pero no letal deben sacrificarse antes de que termine el período del ensayo, y normalmente no se utilizan para el análisis de cometa.

**Recogida de tejidos**

Teniendo en cuenta que es posible estudiar la inducción de la rotura de cadenas de ADN (cometas) en prácticamente cualquier tejido, la justificación de la selección del tejido o tejidos que se van a recoger ha de estar claramente definida y basarse en el motivo de la realización del estudio, junto con los eventuales datos existentes sobre ADME, genotoxicidad, carcinogenicidad u otros tipos de toxicidad en relación con los productos problema sometidos a investigación. Entre los factores importantes que deben considerarse están la vía de administración (sobre la base de la vía o vías probables de exposición humana), la distribución y la absorción tisulares previstas, el papel del metabolismo y el posible mecanismo

▼M7

de acción de los productos problema. El hígado es el tejido estudiado con mayor frecuencia y del que se dispone de más datos. Por lo tanto, a falta de información de fondo, y si no se señala ningún tejido de interés específico, el muestreo del hígado estaría justificado por ser este el principal lugar de metabolismo de las sustancias xenobióticas y estar a menudo muy expuesto tanto a la sustancia original como a sus metabolitos. En algunos casos, puede ser muy pertinente el análisis de un punto de contacto directo (por ejemplo, el estómago glandular o el duodeno/yeyuno en el caso de los productos de administración oral, o los pulmones en el de los productos inhalados). Deben seleccionarse tejidos adicionales o alternativos sobre la base de las razones específicas para la realización del ensayo, pero puede ser útil examinar varios tejidos en los mismos animales, siempre que el laboratorio haya demostrado su competencia con dichos tejidos y con la manipulación de varios tejidos al mismo tiempo.

**Preparación de las muestras**

Para los procesos descritos en los puntos siguientes (44-49) es importante que todas las soluciones o suspensiones estables se utilicen antes de su fecha de caducidad, o que se preparen de nuevo en caso necesario. También en los siguientes puntos, se consideran variables críticas (véanse las definiciones del apéndice 1) los momentos elegidos para: i) retirar cada tejido después de la autopsia, ii) procesar cada tejido para convertirlo en suspensiones de núcleos o células, y iii) procesar la suspensión y preparar los portaobjetos, y deben haberse determinado unos plazos aceptables para cada uno de estas fases durante el establecimiento del método y la demostración de la competencia.

Los animales se sacrifican, de acuerdo con la legislación sobre bienestar animal y el principio de las tres eres, en el momento o momentos adecuados después del último tratamiento con el producto problema. El tejido o tejidos seleccionados se retiran, se disecan, y una parte se recoge para el ensayo del cometa, y, al mismo tiempo, una sección de la misma parte del tejido debe cortarse y colocarse en solución de formaldehído o en un fijador adecuado para su posible examen histopatológico (véase el punto 55) según métodos normalizados (12). Los tejidos para el ensayo del cometa se colocan en solución amortiguadora de picar, se lavan suficientemente con esta solución en frío para retirar la sangre residual, y se conservan en esta solución enfriada con hielo hasta su transformación. También puede realizarse una perfusión *in situ*, por ejemplo con el hígado o el riñón.

Existen muchos métodos publicados para aislar las células/núcleos. Entre ellos figuran el picado de tejidos tales como el hígado y el riñón, el raspado de mucosas en el caso del tubo gastrointestinal, la homogeneización y la digestión enzimática. El estudio de validación del JaCVAM solo estudiaba células aisladas y, por lo tanto, en términos de establecer el método y poder referirse a los datos del estudio del JaCVAM a efectos de demostración de la competencia, es preferible utilizar células aisladas. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que no existía ninguna diferencia esencial en el resultado del ensayo entre utilizar células aisladas o núcleos aislados (8). También se obtuvieron resultados comparables al utilizar métodos diferentes para aislar las células/núcleos (por ejemplo, homogeneización, picado, digestión enzimática y filtración por malla) (55). Por consiguiente, pueden utilizarse tanto células aisladas como núcleos aislados. Los laboratorios deben evaluar a fondo y validar métodos de aislamiento de núcleos/células, específicos de los distintos tejidos. Como se comenta en el punto 40, la persistencia de algunas de las lesiones que dan lugar a la rotura de las cadenas de ADN detectadas por el ensayo del cometa puede ser muy breve (52) (53). Por lo tanto, cualquiera que sea el método utilizado para preparar las suspensiones de células/núcleos aislados, es importante que los tejidos se procesen tan pronto como sea posible una vez que los animales se hayan sacrificado y se pongan en condiciones que reduzcan la eliminación de las lesiones (por ejemplo, manteniendo el tejido a baja temperatura). Las suspensiones celulares deben mantenerse enfriadas con hielo hasta que estén listas para su uso, de modo que puedan demostrarse la mínima variación entre muestras y unas respuestas adecuadas de los testigos positivos y negativos.

▼M7

PREPARACIÓN DE LOS PORTAOBJETOS

La preparación de los portaobjetos debe hacerse tan pronto como sea posible (idealmente en el plazo de una hora) después de la preparación de las células/núcleos aislados, pero la temperatura y el tiempo transcurrido entre la muerte de los animales y la preparación de los portaobjetos deben estar estrictamente controlados y validados con arreglo a las condiciones del laboratorio. El volumen de suspensión celular añadido a agarosa de bajo punto de fusión (generalmente de 0,5 a 1,0 %) para preparar los portaobjetos no debe reducir el porcentaje de la agarosa de bajo punto de fusión a menos del 0,45 %. La densidad celular óptima se determinará mediante el sistema de análisis de imágenes utilizado para examinar los cometas.

**Lisis**

Las condiciones de la lisis también son una variable crítica y pueden interferir con las roturas de cadena debidas a tipos específicos de modificaciones del ADN (ciertas alquilaciones del ADN y adiciones de bases). Se recomienda, por lo tanto, que las condiciones de la lisis se mantengan lo más constantes posible para todos los portaobjetos de un experimento. Una vez preparados, los portaobjetos se sumergen en solución de lisis refrigerada durante al menos una hora (o durante una noche) en torno a 2-8 °C, bajo una iluminación tenue, por ejemplo de luz amarilla (o protegidos de la luz) para evitar su exposición a la luz blanca que puede contener componentes UV. Tras este período de incubación, los portaobjetos deben lavarse para eliminar los restos de detergente y sales antes de la fase de desenrollamiento alcalino. Esto puede hacerse utilizando agua purificada o solución amortiguadora de neutralización o de fosfato. También puede utilizarse la solución amortiguadora de electroforesis. Esto mantendría las condiciones alcalinas en la cámara de electroforesis.

**Desenrollamiento y electroforesis**

Los portaobjetos se colocan de forma aleatoria en la plataforma de una unidad de electroforesis de tipo submarino con una cantidad suficiente de solución de electroforesis, de modo que la superficie de los portaobjetos esté totalmente recubierta (la profundidad de la cobertura debe también ser coherente de una tanda a otra). En otro tipo de unidades de electroforesis para el ensayo del cometa, es decir, con refrigeración activa, circulación y alimentación eléctrica de elevada capacidad, una cobertura más profunda con la solución dará lugar a mayor intensidad de corriente eléctrica a tensión constante. Debe utilizarse un diseño equilibrado para colocar los portaobjetos en el depósito de electroforesis de forma que se mitiguen los efectos de eventuales tendencias o efectos de borde dentro del depósito y se minimice la variabilidad entre lotes, es decir, en cada tanda de electroforesis debe contarse con el mismo número de portaobjetos de cada animal utilizado en el estudio y deben incluirse muestras de los diferentes grupos tratados y de los testigos negativos y positivos. Los portaobjetos se dejan durante al menos 20 minutos para que se desenrolle el ADN y después se someten a la electroforesis en condiciones controladas que maximicen la sensibilidad y el intervalo analítico del ensayo (es decir, que lleven a unos niveles aceptables de porcentaje de ADN de la cola de los testigos positivos y negativos tales que maximicen la sensibilidad). El grado de migración del ADN está asociado linealmente con la duración de la electroforesis, y también con el potencial (V/cm). Sobre la base del ensayo del JaCVAM, estos valores podrían ser 0,7 V/cm durante al menos 20 minutos. La duración de la electroforesis se considera una variable crítica y debe establecerse el tiempo de electroforesis para optimizar el intervalo analítico. Unos tiempos de electroforesis más largos (por ejemplo, de 30 o 40 minutos para maximizar la sensibilidad) suelen dar lugar a respuestas positivas más fuertes con mutágenos conocidos. Sin embargo, unos tiempos de electroforesis más largos también pueden dar lugar a una migración excesiva en las muestras de los testigos. En cada experimento se debe mantener constante la tensión, y la variabilidad de los demás parámetros debe mantenerse dentro de un intervalo estrecho y especificado, por ejemplo en el ensayo del JaCVAM 0,7 V/cm daban una intensidad de corriente inicial de 300 mA. La profundidad de la solución amortiguadora debe ajustarse para permitir las condiciones exigidas y mantenerse a lo largo de todo el experimento. Debe registrarse la intensidad de la corriente al inicio y al final del período de electroforesis. Por tanto, las condiciones óptimas deben determinarse durante la demostración

▼M7

inicial de la competencia en el laboratorio correspondiente con cada tejido estudiado. La temperatura de la solución de electroforesis a lo largo del proceso de desenrollado y electroforesis debe mantenerse baja, generalmente entre 2 y 10 °C (10). Debe registrarse la temperatura de la solución de electroforesis al principio del desenrollado, al inicio de la electroforesis y al final de la electroforesis.

Tras la terminación de la electroforesis, los portaobjetos deben sumergirse en la solución amortiguadora de neutralización (o lavarse con ella) durante al menos 5 minutos. Los geles pueden teñirse y examinarse «en fresco» (por ejemplo, en el plazo de 1 o 2 días) o pueden deshidratarse para su posterior examen (por ejemplo, en el plazo de 1 a 2 semanas después de la tinción) (56). Sin embargo, las condiciones deben validarse durante la demostración de la competencia y deben obtenerse y conservarse datos históricos por separado de cada una de estas condiciones. En caso de que se seleccione la segunda de tales posibilidades, los portaobjetos se deshidratan sumergiéndolos en etanol absoluto durante un mínimo de 5 minutos; después se dejan secar al aire y luego se guardan a temperatura ambiente o en un recipiente en el frigorífico hasta el momento del examen.

**Métodos de medición**

Los cometas deben examinarse cuantitativamente utilizando un sistema de análisis de imágenes automatizado o semiautomatizado. Los portaobjetos se tiñen con un colorante fluorescente apropiado como, por ejemplo, SYBR Gold, Green I, yoduro de propidio o bromuro de etidio, y se miden a un aumento adecuado (por ejemplo, 200x) en un microscopio de epifluorescencia provisto de detectores apropiados o de una cámara digital (por ejemplo, DAC).

Las células pueden clasificarse en tres categorías, según se describe en el Atlas de imágenes de cometas (57), a saber: evaluables, no evaluables y «erizo» (véase en el punto 56 un análisis más detallado). Para evitar artefactos, el porcentaje de ADN de la cola debe evaluarse solo en las células evaluables (cabeza y cola claramente definidas, sin ninguna interferencia con las células adyacentes). No es necesario informar de la frecuencia de las células no evaluables. La frecuencia de los erizos debe determinarse sobre la base del examen visual (puesto que la ausencia de una cabeza claramente definida significa que no son detectados fácilmente por análisis de imágenes) de al menos 150 células por muestra (véase en el punto 56 una discusión más profunda) y documentarse por separado.

Todos los portaobjetos que se hayan de analizar, incluidos los de los testigos positivos y negativos, deben codificarse independientemente y deben examinarse de forma aleatorizada, tal que el examinador no tenga conocimiento de cómo se han tratado. De cada muestra (por tejido y por animal) deben analizarse al menos 150 células (excepto los erizos, véase el punto 56). El examen de 150 células por animal, en al menos 5 animales por dosis (salvo en el testigo positivo en paralelo, véase el punto 29), supone una potencia estadística adecuada según el análisis de Smith *et al*., 2008 (5). Si se utilizan portaobjetos, esto podría hacerse con el examen de 2 o 3 portaobjetos por muestra cuando se utilizan cinco animales por grupo. Deben observarse varias zonas del portaobjeto con una densidad que garantice que no hay solapamiento de colas. Debe evitarse la evaluación cerca de los bordes de los portaobjetos.

Las roturas de las cadenas de ADN en el ensayo del cometa se pueden medir con criterios de valoración independientes, tales como el porcentaje de ADN de la cola, y la longitud y el momento de esta. Pueden hacerse las tres mediciones si se utiliza un programa informático apropiado de análisis de imágenes. No obstante, el porcentaje de ADN de la cola (también conocido como porcentaje de intensidad de la cola) se recomienda para la evaluación e interpretación de los resultados (12) (40) (41) (42), y se determina mediante la intensidad del fragmento de ADN de la cola, expresada como porcentaje de la intensidad total de la célula (13).

▼M7

**Lesiones en los tejidos y citotoxicidad**

Los resultados positivos en el ensayo del cometa pueden no deberse únicamente a la genotoxicidad, sino que la toxicidad para el tejido diana también puede dar lugar a un aumento de la migración del ADN (12) (41). Por el contrario, a menudo se observa baja o moderada citotoxicidad con genotoxinas conocidas (12), lo que indica que no es posible distinguir la migración de ADN inducida por la genotoxicidad frente a la inducida por la citotoxicidad en el ensayo del cometa solo. No obstante, en caso de que se observen aumentos en la migración de ADN, se recomienda efectuar el examen de uno o más indicadores de citotoxicidad, como ayuda en la interpretación de los resultados. Los aumentos en la migración de ADN en presencia de pruebas claras de citotoxicidad deben interpretarse con cautela.

Se han propuesto muchas mediciones de la citotoxicidad y de estos cambios histopatológicos, que se consideran una medición pertinente de la toxicidad para los tejidos. Ciertas observaciones, tales como la inflamación, la infiltración celular, o cambios apoptóticos o necróticos, se han asociado con aumentos en la migración del ADN; sin embargo, como se demostró en el estudio de validación del JaCVAM (12), no se dispone de ninguna lista definitiva de cambios histopatológicos que estén siempre asociados a un aumento de la migración del ADN. Los cambios en ciertos parámetros de química clínica (por ejemplo, AST, ALT) también pueden proporcionar información útil sobre las lesiones tisulares y pueden tenerse en cuenta asimismo otros indicadores, tales como la activación de la caspasa, la tinción de TUNEL, la tinción de la anexina V, etc. Sin embargo, hay pocos datos publicados sobre estudios *in vivo* en los que se hayan utilizado tales indicadores y unos pueden ser menos fiables que otros.

Los erizos (o nubes, o células fantasma) son células que presentan una imagen al microscopio compuesta por una cabeza pequeña o inexistente y una cola grande y difusa, y se consideran células muy dañadas, aunque su etiología es incierta (véase el apéndice 3). Debido a su aspecto, son poco fiables las mediciones del porcentaje de ADN de la cola por análisis de imágenes, por lo que los erizos deben evaluarse por separado. La presencia de erizos debe registrarse y comunicarse, y se debe investigar e interpretar con cautela cualquier incremento relevante cuyo origen pueda considerarse que es el producto problema. El conocimiento del posible modo de acción de los productos problema puede ayudar a dichas consideraciones.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

La unidad experimental es el animal y, por lo tanto, se deben presentar en forma tabular tanto los datos relativos a cada animal como un resumen de los resultados. Debido a la naturaleza jerárquica de los datos, se recomienda que se determine la mediana del porcentaje de ADN de la cola para cada portaobjetos y que se calcule la media de los valores de la mediana para cada animal (12). A continuación se determina la media de las medias de cada animal, para dar la media del grupo. Todos estos valores deben incluirse en el informe. Pueden aplicarse planteamientos alternativos (véase el punto 53) cuando estén justificados desde el punto de vista científico y estadístico. El análisis estadístico se puede realizar con una variedad de planteamientos (58) (59) (60) (61). A la hora de decidir qué métodos estadísticos utilizar, debe tenerse en cuenta la necesidad de transformar (por ejemplo, logaritmo o raíz cuadrada) los datos o de añadir un pequeño número (por ejemplo, 0,001) a todos los valores (incluso a los distintos de cero) para mitigar los efectos de los valores celulares iguales a cero, como se indica en las referencias anteriormente mencionadas. En el apéndice 2 se encuentran datos del análisis de las interacciones tratamiento/sexo cuando se utilizan animales de ambos sexos, y del posterior análisis de los datos cuando se encuentran diferencias o no. Deben también consignarse los datos sobre toxicidad y signos clínicos.

**Criterios de aceptabilidad**

La aceptabilidad de un ensayo se basa en los criterios siguientes:

a. El testigo negativo en paralelo se considera aceptable para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio de acuerdo con lo descrito en el punto 16.

▼M7

b. Los testigos positivos en paralelo (véase el punto 29) deben inducir respuestas compatibles con las obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo.

c. Se han analizado números apropiados de células y de dosis (puntos 52 y 36-38).

d. Los criterios de selección de la concentración más alta son coherentes con los descritos en el punto 36.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si:

a. al menos una de las dosis de ensayo produce un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

b. el aumento está relacionado con la dosis cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

c. alguno de los resultados está fuera de la distribución de los datos de los testigos negativos históricos respecto a una especie, vehículo, vía, tejido, y número de administraciones determinados.

Cuando se cumplen todos estos criterios, el producto problema se considera capaz de inducir roturas de las cadenas de ADN en los tejidos estudiados en este sistema de ensayo. Si se cumplen solo uno o dos de estos criterios, véase el punto 62.

Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si:

a. ninguna de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

b. no hay ningún aumento relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

c. todos los resultados están dentro de la distribución de los datos de los testigos negativos históricos respecto a una especie, vehículo, vía, tejido, y número de administraciones determinados,

d. se han obtenido pruebas que apoyan directa o indirectamente la exposición del tejido o tejidos diana (o la toxicidad para estos).

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir roturas de las cadenas de ADN en los tejidos estudiados en este sistema de ensayo.

No se requiere ninguna verificación de una respuesta claramente positiva o negativa.

En caso de que la respuesta no sea ni claramente positiva ni claramente negativa (es decir, si no se cumplen todos los criterios incluidos en los puntos 59 o 60) y a fin de ayudar a determinar la importancia biológica de un resultado, los datos deben ser evaluados por expertos o mediante más investigaciones, cuando esté justificado científicamente. Puede ser útil examinar células adicionales (en su caso) o realizar una repetición del experimento quizá optimizando las condiciones experimentales, como, por ejemplo, la separación entre dosis, las vías de administración, el momento de la toma de muestras o los tejidos empleados.

En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos no permite que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo, por lo que se considerará dudoso.

▼M7

Para evaluar la importancia biológica de un resultado positivo o dudoso, hay que disponer de información sobre la citotoxicidad en el tejido diana (véanse los puntos 54-55). Cuando se observan resultados positivos o dudosos únicamente en presencia de claros signos de citotoxicidad, se concluirá que el estudio es dudoso en cuanto a la genotoxicidad, a menos que exista suficiente información que apoye una conclusión definitiva. En los casos de resultado negativo de un estudio en que haya signos de toxicidad a todas las dosis sometidas a ensayo, puede ser aconsejable proceder a nuevos estudios a dosis no tóxicas.

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

— origen y número de lote, si está disponible;

— estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha de nuevo análisis, si se conoce.

*Sustancia con un solo componente:*

— aspecto físico, hidrosolubilidad, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.

*Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas:*

— en la medida de lo posible, caracterizadas por la identidad química (véase más arriba), presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes.

*Disolvente o vehículo:*

— justificación de la elección del disolvente o vehículo;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen;

— preparación de las formulaciones administradas;

— determinaciones analíticas de las formulaciones (por ejemplo, estabilidad, homogeneidad, concentraciones nominales).

*Animales de ensayo:*

— especie y cepa utilizadas y justificación científica y ética de la elección;

— número, edad y sexo de los animales;

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, agua, etc.;

— peso de cada animal al principio y al final del ensayo, incluido el intervalo de pesos corporales, la media y la desviación típica de cada grupo.

*Condiciones del ensayo:*

— datos de los testigos positivos y negativos (vehículo o disolvente);

▼M7

— resultados del estudio de determinación del intervalo, si se ha llevado a cabo;

— justificación de la selección de las dosis;

— datos de la formulación del producto problema;

— datos sobre la administración del producto problema;

— fundamento de la elección de la vía de administración;

— punto de inyección (en estudios por vía subcutánea o intravenosa);

— métodos de preparación de las muestras, cuando estén disponibles, análisis histopatológicos, especialmente en el caso de un producto que dé una respuesta positiva en el ensayo del cometa;

— justificación de la selección de los tejidos;

— métodos de comprobación de que el producto problema ha alcanzado el tejido diana, o la circulación general, si se obtienen resultados negativos;

— dosis reales (mg/kg peso corporal/día) calculadas a partir del consumo y de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida, en su caso;

— datos sobre la calidad de los alimentos y del agua;

— descripción detallada de las pautas de tratamiento y muestreo y justificación de las decisiones (p. ej., datos toxicocinéticos, cuando estén disponibles);

— método de alivio del dolor, analgesia;

— método de sacrificio compasivo;

— procedimientos de aislamiento y conservación de los tejidos;

— métodos de preparación de la suspensión de células/núcleos aislados;

— origen y números de lote de todos los reactivos (cuando sea posible);

— métodos para evaluar la citotoxicidad;

— condiciones de la electroforesis;

— técnicas de tinción utilizadas; y

— métodos de evaluación y medición de los cometas.

*Resultados:*

— observaciones clínicas generales, en su caso, antes del período de ensayo de cada animal, y durante el mismo;

— pruebas de la citotoxicidad, si se dispone de ellas;

▼M7

— para los estudios de más de una semana: peso corporal individual al principio del ensayo, incluido el intervalo de pesos corporales, la media y la desviación típica de cada grupo; consumo de alimentos;

— relación dosis-respuesta, cuando sea clara;

— respecto a cada tejido o animal, el porcentaje de ADN de la cola (u otros parámetros, si se han elegido) y valores de la mediana por portaobjetos, valores medios por animal y valores medios por grupo;

— datos sobre los testigos negativos en paralelo e históricos, con los intervalos, medias/medianas y desviaciones típicas de cada tejido evaluado;

— datos de los testigos positivos en paralelo e históricos;

— respecto a los tejidos distintos del hígado, una curva dosis-respuesta utilizando el testigo positivo; esta puede hacerse con datos recogidos en la demostración de la competencia (véanse los puntos 16-17) y debe acompañarse de una justificación, con referencias a la bibliografía actual, en cuanto a la adecuación de la magnitud y la dispersión de las respuestas a los testigos en ese tejido;

— análisis estadísticos y métodos aplicados, y criterios empleados para considerar si una respuesta es positiva, negativa o dudosa;

— frecuencia de la presencia de erizos en cada grupo y por animal.

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

*Bibliografía*

BIBLIOGRAFÍA

(1) Kirkland, D., G. Speit (2008), Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*, *Mutation Research*, Vol. 654/2, pp. 114-32.

(2) Brendler-Schwaab, S. *et al*. (2005), The *in vivo* Comet assay: use and status in genotoxicity testing, *Mutagenesis*, Vol. 20/4, pp. 245-54.

(3) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(4) Burlinson, B. (2012), The *in vitro* and *in vivo* Comet assays, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 143-63.

(5) Smith, C.C. *et al*. (2008), Recommendations for design of the rat Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 233-40.

(6) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/1, pp. 45-51.

(7) McKelvey-Martin, V.J. *et al*. (1993), The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): a European review, *Mutation Research*, Vol. 288/1, pp. 47-63.

(8) Tice, R.R. *et al*. (2000), Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 35/3, pp. 206-21.

▼M7

(9) Singh, N.P. *et al*. (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, Vol. 175/1, pp. 184-91.

(10) Rothfuss, A. *et al*. (2010), Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies, *Mutation Research*, Vol., 702/1, pp. 40-69.

(11) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No. 234, OECD, Paris.

(12) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(13) Olive, P.L., J.P. Banath, R.E. Durand (1990), Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the «Comet» assay, *Radiation Research*, Vol. 122/1, pp. 86-94.

(14) Tice, R.R., G.H. Strauss (1995), The single cell gel electrophoresis/Comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans, *Stem Cells*, Vol. 13/1, pp. 207-14.

(15) Collins, A.R (2004), The Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Molecular Biotechnology*, Vol. 26/3, pp. 249-61.

(16) Rothfuss, A. *et al*. (2011), Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 723/2, pp. 108-20.

(17) Kushwaha, S. *et al*. (2010), Evaluation of multi-organ DNA damage by Comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: A practical approach for test integration in regulatory toxicity testing, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 58/1, pp. 145–54.

(18) Vasquez, M.Z. (2010), Combining the *in vivo* Comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 187-99.

(19) Bowen, D.E. (2011), Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test, *Mutation Research*, Vol. 722/1, pp. 7-19.

(20) Recio, L. *et al*. (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *The Journal of Toxicological Science*, Vol. 35/2, pp. 149-62.

(21) O'Donovan, M., B. Burlinson (2013), Maximum dose levels for the rodent comet assay to examine damage at the site of contact or to the gastrointestinal tract, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 621-3.

(22) Hartmann, A. (2004), **Use of the alkaline *in vivo* Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations,** *Mutagenesis*, Vol. 19/1, pp. 51-9.

(23) Nesslany, F. (2007), *In vivo* Comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 630/1, pp. 28-41.

(24) Brendler-Schwaab, S.Y., B.A. Herbold (1997), A new method for the enrichment of single renal proximal tubular cells and their first use in the Comet assay, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 393/1-2, pp. 175-8.

▼M7

(25) Toyoizumi, T. *et al*. (2011), Use of the *in vivo* skin Comet assay to evaluate the DNA-damaging potential of chemicals applied to the skin, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 726/2, pp. 175-80.

(26) Struwe, M. *et al*. (2008), Detection of photogenotoxicity in skin and eye in rat with the photo Comet assay, *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol. 7/2, pp. 240-9.

(27) Wada, K. *et al*. (2012), A comparison of cell-collecting methods for the Comet assay in urinary bladders of rats, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 742/1-2, pp. 26-30.

(28) Wang, A. *et al*. (2007), Measurement of DNA damage in rat urinary bladder transitional cells: improved selective harvest of transitional cells and detailed Comet assay protocols, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 634/ 1-2, pp. 51-9.

(29) Burlinson, B. *et al*. (2007), *In Vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 627/1, pp. 31-5.

(30) Jackson, P. *et al*. (2012), Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring, *Nanotoxicology*, Vol. 6/5, pp. 486-500.

(31) Sasaki, Y.F. *et al*. (2000), The comet assay with multiple mouse organs: comparison of Comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 30/6, pp. 629-799.

(32) Sekihashi, K. *et al*. (2002), Comparative investigations of multiple organs of mice and rats in the Comet assay, *Mutation Research*, Vol. 517/1-2, pp. 53-74.

(33) Speit, G, M. Vasquez, A. Hartmann (2009), **The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity,** *Mutation Research*, Vol. 681/1, pp. 3-12.

(34) Zheng, H., P.L. Olive (1997), Influence of oxygen on radiation-induced DNA damage in testicular cells of C3H mice, *International Journal of Radiation Biology*, Vol. 71/3, pp. 275-282.

(35) Cordelli, E. *et al*. (2003), Evaluation of DNA damage in different stages of mouse spermatogenesis after testicular X irradiation, *Journal of Radiation Research*, Vol. 160/4, pp. 443-451.

(36) Merk, O., G. Speit (1999), Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 33/2, pp. 167-72.

(37) Pfuhler, S., H.U. Wolf (1996), Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline Comet assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 27/3, pp. 196-201.

(38) Wu, J.H., N.J. Jones (2012), Assessment of DNA interstrand crosslinks using the modified alkaline Comet assay, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 817, pp. 165-81.

(39) Spanswick, V.J., J.M. Hartley, J.A. Hartley (2010), **Measurement of DNA interstrand crosslinking in individual cells using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay,** *Methods in Molecular Biology*, Vol. 613, pp. 267-282.

▼M7

(40) Kumaravel, T.S., A.N. Jha (2006), Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 605(1-2), pp. 7-16.

(41) Burlinson, B. *et al*. (2007), Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: result of the *in vivo* Comet assay workgroup, *Mutation Research*, Vol.627/1, pp. 31-5.

(42) Kumaravel, T.S. *et al*. (2009), Comet Assay measurements: a perspective, *Cell Biology and Toxicology*, Vol. 25/1, pp. 53-64.

(43) Ersson, C., L. Möller (2011), The effects on DNA migration of altering parameters in the Comet assay protocol such as agarose density, electrophoresis conditions and durations of the enzyme or the alkaline treatments, *Mutagenesis*, Vol. 26/6, pp. 689-95.

(44) Møller, P. *et al*. (2010), Assessment and reduction of Comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 109-11.

(45) Forchhammer, L. *et al*. (2010), Variation in the measurement of DNA damage by Comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial, *Mutagenesis*, Vol. 25/2, pp. 113-23.

(46) Azqueta, A. *et al*. (2011), Towards a more reliable comet assay: Optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions, *Mutation Research*, Vol. 724/1-2, pp. 41-45.

(47) Hayashi, M. *et al*. (2011), Compilation and use of genetic toxicity historical control data, *Mutation Research*, Vol. 723/2, pp. 87-90.

(48) Ryan, T. P. (2000), *Statistical Methods for Quality Improvement,* John Wiley and Sons, New York 2nd ed.

(49) Apéndice A del Convenio Europeo sobre protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos (STE n.º 123)

(50) Capítulo B.8 del presente anexo, Toxicidad subaguda por inhalación: estudio de 28 días.

(51) Capítulo B.29 del presente anexo, Toxicidad subcrónica por inhalación: estudio de 90 días.

(52) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1984), Transient DNA lesions induced by benzo[a]pyrene in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 140/2-3, pp. 141-45.

(53) Blakey, D.H., G.R. Douglas (1990), The role of excision repair in the removal of transient benzo[a]pyrene-induced DNA lesions in Chinese hamster ovary cells, *Mutation Research*, Vol. 236/1, pp. 35-41.

(54) OCDE (2002), «Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 19, OECD Publishing, Paris.

(55) Nakajima, M. (2012), Tissue sample preparation for *in vivo* rodent alkaline Comet assay, *Genes and Environment*, Vol. 34/1, pp. 50-4.

(56) Hartmann, A. *et al*. (2003), Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay, *Mutagenesis*, Vol.18/1, pp.45–51.

(57) Atlas of Comet Assay Images, Scientist Press Co., Ltd., Tokyo, Japan.

(58) Lovell, D.P., G. Thomas, R. Dubow (1999), Issues related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* Comet studies, *Teratogenesis Carcinogenesis Mutagenesis*, Vol. 19/2, pp. 109-19.

▼**M7**

(59) Wiklund, S.J., E. Agurell (2003), Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 18/2, pp. 167-75.

(60) Bright, J. *et al*. (2011), Recommendations on the statistical analysis of the Comet assay, *Pharmaceutical Statistics*, Vol. 10/6, pp. 485-93.

(61) Lovell, D.P., T. Omori (2008), Statistical issues in the use of the Comet assay, *Mutagenesis*, Vol. 23/3, pp. 171-82.

▼**M7**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Electroforesis en gel de células aisladas en condiciones alcalinas**: Técnica sensible para la detección de lesiones primarias del ADN a nivel de células/núcleos individuales.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Cometa**: Forma que adoptan los nucleoides después de someterse a un campo electroforético, debido a su similitud con los cometas: la cabeza es el núcleo y la cola está constituida por el ADN que migra afuera del núcleo en el campo eléctrico.

**Variable/parámetro crítico**: Variable del protocolo cuyos pequeños cambios pueden tener una gran incidencia en la conclusión del ensayo. Las variables críticas pueden ser específicas de cada tejido. Las variables críticas no deben alterarse, especialmente dentro de un ensayo, sin tener en cuenta cómo la modificación va a alterar una respuesta del ensayo, por ejemplo según indiquen la magnitud y la variabilidad en los testigos positivos y negativos. El informe del ensayo debe enumerar las alteraciones de variables críticas aportadas durante el ensayo o en comparación con el protocolo de referencia en el laboratorio y proporcionar una justificación de cada alteración.

**Intensidad de la cola o porcentaje de ADN de la cola**: Esto corresponde a la intensidad de la cola del cometa con respecto a la intensidad total (cabeza y cola). Refleja la cantidad de roturas del ADN, y se expresa como porcentaje.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos.

▼M7

*Apéndice 2*

## DISEÑO FACTORIAL PARA IDENTIFICAR LAS DIFERENCIAS DE SEXO EN EL ENSAYO DEL COMETA *IN VIVO*

### Diseño factorial y su análisis

En este diseño, un mínimo de 5 machos y 5 hembras se someten a ensayo a cada concentración, lo que resulta en la utilización de un mínimo de 40 animales (20 machos y 20 hembras, más los testigos positivos pertinentes).

Este diseño, que es uno de los diseños factoriales más simples, es equivalente a un análisis de varianza de dos factores, con el sexo y el nivel de concentración como efectos principales. Los datos pueden analizarse con numerosos paquetes de software estadístico estándar tales como SPSS, SAS, STATA, Genstat, así como utilizando R.

El análisis divide la variabilidad de la serie de datos en variabilidad entre los sexos, variabilidad entre las concentraciones y variabilidad relativa a la interacción entre los sexos y las concentraciones. Cada uno de los términos se somete a prueba frente a una estimación de la variabilidad entre los animales replicados dentro de los grupos de animales del mismo sexo que han recibido la misma concentración. Todos los detalles de la metodología subyacente se encuentran en muchos manuales estadísticos conocidos (véanse las referencias) y en las funciones de «ayuda» de los paquetes estadísticos.

El análisis se lleva a cabo inspeccionando el término de la interacción sexo x concentración en el cuadro de ANOVA ([1]). A falta de un término de interacción significativo, los valores combinados de distintos sexos o niveles de concentración ofrecen pruebas estadísticas válidas entre los niveles, sobre la base del término de ANOVA de variabilidad intragrupo puesta en común.

El análisis continúa dividiendo la estimación de la variabilidad entre concentraciones en contrastes que permiten una prueba de contrastes lineales y cuadráticos de las respuestas a través de los niveles de concentración. Cuando existe un término de interacción significativa sexo x concentración, este término también puede dividirse en contrastes de interacción lineal x sexo y cuadrático x sexo. Estos términos permiten pruebas de si las respuestas a la concentración son paralelas en los dos sexos, o si existe una diferencia en la respuesta entre estos.

La estimación de la variabilidad intragrupo puesta en común se puede utilizar para proporcionar pruebas pareadas de la diferencia entre medias. Estas comparaciones podrían realizarse entre las medias para los dos sexos y entre las medias para los diferentes niveles de concentración, así como para las comparaciones con los niveles de los testigos negativos. En los casos en los que existe una interacción significativa pueden hacerse comparaciones entre las medias de concentraciones diferentes dentro de un sexo o entre las medias de los sexos a la misma concentración.

### Bibliografía

Hay muchos manuales estadísticos que debaten la teoría, el diseño, la metodología, el análisis y la interpretación de los diseños factoriales que van desde los análisis bifactoriales más sencillos hasta las formas más complejas utilizadas en la metodología de diseño de experimentos. La lista que sigue no es exhaustiva. Algunos libros proporcionan ejemplos resueltos de diseños comparables, en algunos casos con el código para aplicar los análisis utilizando diversos paquetes de software.

([1]) Los estadísticos que siguen un enfoque de modelización como el de usar modelos lineales generales pueden plantear el análisis de forma diferente, pero comparable, sin derivar necesariamente el cuadro tradicional de ANOVA, que se basa en enfoques algorítmicos para calcular las estadísticas elaboradas en una época pre-informática.

▼**M7**

(1) Box, G.E.P, Hunter, W.G. and Hunter, J.S. (1978). Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. New York: John Wiley & Sons.

(2) Box G.E.P. & Draper, N.R. (1987) Empirical model-building and response surfaces. John Wiley & Sons Inc.

(3) Doncaster, C.P. & Davey, A.J.H. (2007) Analysis of Variance and Covariance: How to Choose and Construct Models for the Life Sciences. Cambridge University Press.

(4) Mead, R. (1990) The Design of Experiments. Statistical principles for practical application. Cambridge University Press.

(5) Montgomery D.C. (1997) Design and Analysis of Experiments. John Wiley & Sons Inc.

(6) Winer, B.J. (1971) Statistical Principles in Experimental Design. McGraw Hill.

(7) Wu, C.F.J & Hamada, M.S. (2009) Experiments: Planning, Analysis and Optimization. John Wiley & Sons Inc.

▼M7

*Apéndice 3*

**LIMITACIONES ACTUALES DEL ENSAYO**

Debido al estado actual de los conocimientos, el ensayo del cometa *in vivo* tiene asociadas varias limitaciones. Se espera que estas limitaciones se reduzcan o definan de manera más estricta según se vaya ganando más experiencia con la aplicación del ensayo para responder a cuestiones de seguridad en un contexto reglamentario.

1. Algunos tipos de lesiones del ADN pueden ser de corta duración, es decir, pueden repararse con demasiada rapidez como para observarse cuando hayan pasado 24 horas o más desde la última administración. No se puede identificar ninguna lista de las lesiones de breve duración, ni de los productos que pueden provocar este tipo de lesiones, y tampoco se sabe en qué plazo puede detectarse este tipo de lesiones. El tiempo o tiempos de muestreo óptimo pueden también ser específicos del producto o de la vía de aplicación, y los tiempos de muestreo deben determinarse a partir de los datos cinéticos (por ejemplo, el tiempo, $T_{máx}$, al que se obtiene la concentración plasmática o tisular máxima), cuando se disponga de tales datos. La mayoría de los estudios de validación en apoyo de este método de ensayo especificaban la autopsia a las 2 o 3 horas tras la administración de la última dosis. La mayor parte de los estudios publicados en la bibliografía describen la administración de la dosis final entre 2 y 6 horas antes del sacrificio. Por lo tanto, estas experiencias se utilizaron como base para la recomendación recogida en el método de ensayo de que, a falta de datos que indiquen lo contrario, la dosis final debe administrarse en un momento concreto entre 2 y 6 horas antes de la autopsia.

2. No hay datos de estudios identificables que permitan examinar la sensibilidad del ensayo para la detección de las lesiones del ADN de breve duración tras la administración del producto con los alimentos o el agua de bebida, en comparación con la administración por sonda. Se han detectado lesiones del ADN tras la administración con los alimentos y el agua de bebida, aunque hay relativamente pocos informes de este tipo frente a la experiencia mucho mayor sobre la administración con sonda e intraperitoneal. Así pues, la sensibilidad del ensayo puede verse reducida en caso de productos que provocan lesiones de breve duración administrados con los alimentos o el agua potable.

3. No se han llevado a cabo estudios interlaboratorios en tejidos distintos de hígado y estómago, por lo que no se ha establecido ninguna recomendación sobre cómo lograr una respuesta sensible y reproducible en tejidos distintos del hígado, tales como unos intervalos previstos de los testigos positivos y negativos. En el caso del hígado, tampoco pudo alcanzarse ningún acuerdo sobre el establecimiento de un límite inferior para el valor del testigo negativo.

4. Aunque existen varias publicaciones que demuestran el efecto de confusión de la citotoxicidad *in vitro*, se han publicado muy pocos datos *in vivo* y, por consiguiente, no puede recomendarse ninguna medida de citotoxicidad. Ciertos cambios histopatológicos, tales como la inflamación, la infiltración celular, o los cambios apoptóticos o necróticos, se han asociado con aumentos en la migración del ADN; sin embargo, como se demostró en el estudio de validación del JaCVAM (OCDE, 2014), estos cambios no provocan siempre unos resultados positivos en el ensayo del cometa y, por tanto, no se dispone de ninguna lista definitiva de cambios histopatológicos que estén siempre asociados a un aumento de la migración del ADN. En el pasado se han sugerido los erizos (o nubes, o células fantasma) como indicador de la citotoxicidad; sin embargo, la etiología de los erizos es dudosa. Existen datos que indican que pueden deberse a la citotoxicidad relacionada con los productos o a lesiones inducidas de forma mecánica o enzimática durante la preparación de la muestra (Guerard *et al*., 2014), o ser un efecto más extremo de la genotoxicidad del producto problema. Otros datos parecen demostrar que se deben a unas lesiones del ADN amplias pero quizás reparables (Lorenzo *et al.*, 2013).

▼M7

5. Se han congelado con éxito tejidos o núcleos celulares para su posterior análisis. Esto suele traducirse en un efecto mensurable sobre la respuesta al testigo del vehículo y al testigo positivo (Recio *et al.*, 2010; Recio *et al*., 2012; Jackson *et al*., 2013). En caso de que se utilice esta posibilidad, el laboratorio debe demostrar su competencia con las metodologías de congelación y confirmar unos bajos intervalos aceptables de porcentaje de ADN de la cola en los tejidos diana de animales tratados con el vehículo, y que aún pueden detectarse las respuestas positivas. En la bibliografía se ha descrito la congelación de los tejidos utilizando distintos métodos. Sin embargo, actualmente no hay acuerdo sobre la mejor manera de congelar y descongelar los tejidos, ni sobre cómo evaluar si una posible respuesta modificada puede afectar a la sensibilidad del ensayo.

6. Un trabajo reciente demuestra que se espera que la lista de variables críticas continúe abreviándose y los parámetros de las variables críticas se definan de manera más precisa (Guerard *et al.*, 2014).

**Bibliografía**

(1) Guerard, M., C. Marchand, U. Plappert-Helbig (2014), Influence of Experimental Conditions on Data Variability in the Liver Comet Assay, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 55/2, pp. 114-21.

(2) Jackson, P. *et al*. (2013), Validation of use of frozen tissues in high-throughput comet assay with fully-automatic scoring, *Mutagenesis*, Vol. 28/6, pp. 699-707.

(3) Lorenzo,Y. *et al*. (2013), **The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead,** *Mutagenesis*, Vol. 28/4, pp. 427-32.

(4) OCDE (2014), *Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the in vivo rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens*, Series on Testing and Assessment, Nos. 195 and 196, OECD Publishing, Paris.

(5) Recio L, Hobbs C, Caspary W, Witt KL, (2010), Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol, *J. Toxicol. Sci.* 35:149-62.

(6) Recio, L. *et al*. (2012), Comparison of Comet assay dose-response for ethyl methanesulfonate using freshly prepared versus cryopreserved tissues, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, Vol. 53/2, pp. 101-13.

▼M8

## B.63 ENSAYO DE CRIBADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 421 de la OCDE (2016). Las directrices de la OCDE sobre los ensayos de productos se revisan periódicamente a la luz del progreso científico,. Las directrices de ensayo de cribado TG 421 originales se adoptaron en 1995 sobre la base de un protocolo de un «ensayo de cribado preliminar de toxicidad para la reproducción», debatido en dos reuniones de expertos, celebradas en Londres en 1990 (1) y en Tokio en 1992 (2).

2. Este método de ensayo se ha actualizado con parámetros pertinentes de alteración endocrina, como continuación de la actividad prioritaria iniciada en 1998 en la OCDE para revisar las directrices de ensayo vigentes y elaborar nuevas directrices de ensayo para el cribado y el ensayo de los alteradores endocrinos potenciales (3). Por ejemplo, las directrices de ensayo TG 407 de la OCDE [Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en roedores, capítulo B.7 del presente anexo] se reforzaron en 2008 con parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina de los productos problema. El objetivo de la actualización de las directrices de ensayo TG 421 era incluir algunos parámetros relevantes de alteración endocrina en las directrices de ensayo de cribado, en las que los períodos de exposición cubren algunos de los períodos sensibles durante el desarrollo (periodos prenatal y posnatal inicial).

3. En las directrices de ensayo TG 421 se incluyeron los parámetros adicionales pertinentes de alteración endocrina seleccionados, que también forman parte de las directrices TG 443 (Estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación, capítulo B.56 del presente anexo), sobre la base de un estudio de viabilidad sobre cuestiones científicas y técnicas relacionadas con su inclusión, así como las posibles adaptaciones del diseño del ensayo necesarias para su inclusión (4).

4. El presente método de ensayo está diseñado para generar información limitada sobre los efectos de un producto problema en el comportamiento reproductor de los machos y de las hembras, tales como la actividad gonadal, el comportamiento relativo al apareamiento, la concepción, el desarrollo del embrión y el parto. No es una alternativa ni sustituye a los métodos de ensayo existentes B.31, B.34, B.35 o B.56.

### CONSIDERACIONES INICIALES

5. Este método de ensayo de cribado puede utilizarse para proporcionar información inicial en cuanto a los posibles efectos sobre la reproducción o el desarrollo, en una fase temprana de la evaluación de las propiedades toxicológicas de los productos, o en cuanto a productos preocupantes. También puede utilizarse como parte de una serie de ensayos iniciales de cribado con sustancias existentes sobre las que se dispone de escasa o nula información toxicológica, como estudio de determinación del intervalo de dosis para estudios más amplios sobre la reproducción o el desarrollo, o en cualquier otro caso que se considere pertinente. Al realizar el estudio, deben aplicarse los principios y consideraciones básicos recogidos en el documento de orientación de la OCDE n.º 19 sobre el reconocimiento, evaluación y utilización de los signos clínicos como parámetros de tratamiento compasivo para los animales de experimentación empleados en las evaluaciones de la seguridad (5).

▼**M8**

6. El presente método de ensayo no proporciona información completa sobre todos los aspectos de la reproducción y el desarrollo. En particular, solo ofrece medios limitados para detectar las manifestaciones postnatales de una exposición prenatal, o los efectos que puedan inducirse durante la exposición posnatal. Debido (entre otras razones) al número relativamente reducido de animales en los grupos tratados, la selectividad de los criterios de valoración y la corta duración del estudio, este método no aporta pruebas para hacer alegaciones definitivas de efectos nulos. Por otra parte, a falta de datos de otros ensayos de toxicidad para la reproducción o el desarrollo, los resultados positivos son útiles para la evaluación inicial del peligro y contribuyen a la adopción de decisiones con respecto a la necesidad y el calendario de ensayos adicionales.

7. Los resultados obtenidos por medio de parámetros endocrinos deben contemplarse en el contexto del «Marco conceptual para el estudio y la evaluación de los alteradores endocrinos» (*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) de la OCDE (6). En este Marco conceptual, las directrices TG 421 mejoradas de la OCDE figuran en el nivel 4 como ensayo *in vivo* que proporciona datos sobre los efectos adversos relativos a los parámetros endocrinos pertinentes. Sin embargo, una señal endocrina podría no considerarse prueba suficiente por sí misma de que el producto problema es un alterador endocrino.

8. En este método de ensayo se parte de la administración oral del producto problema. Es posible que se requieran modificaciones si se utilizan otras vías de exposición.

9. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

10. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. Se administra el producto problema en dosis escalonadas a varios grupos de machos y hembras. Los machos deben recibir el producto durante un mínimo de cuatro semanas y hasta el día anterior al sacrificio programado (incluido dicho día) (lo que comprende un mínimo de dos semanas antes del apareamiento, el período de apareamiento y, aproximadamente, dos semanas después del apareamiento). Teniendo en cuenta lo limitado del período de administración a los machos antes del apareamiento, la fertilidad puede no ser un indicador específico sensible de la toxicidad testicular. Por lo tanto, es esencial un examen histológico detallado de los testículos. Para permitir la detección de la mayor parte de los efectos sobre la fertilidad masculina y la espermatogénesis, se considera suficiente la combinación de un período de administración antes del apareamiento de dos semanas y, posteriormente, observaciones sobre el apareamiento y la fertilidad, con un período de administración total de al menos cuatro semanas, seguido de un examen histopatológico detallado de las gónadas masculinas.

12. Las hembras deben recibir el producto problema a lo largo de todo el estudio. Se incluyen aquí dos semanas antes del apareamiento (con el objetivo de abarcar por lo menos dos ciclos estrales completos), el período de tiempo variable hasta la concepción, la duración de la gestación y al menos trece días después del parto, hasta el día anterior al sacrifico programado, inclusive.

13. La duración del estudio, tras la aclimatación y la evaluación del ciclo estral antes de la administración del producto problema, depende del comportamiento de las hembras y es de aproximadamente 63 días, [14 días como mínimo antes del apareamiento, (hasta) 14 días de apareamiento, 22 días de gestación y 13 días de lactancia].

▼M8

14. A lo largo del período de administración, se observa a los animales todos los días atentamente con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el período del ensayo, y al final del mismo se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

15. Este método de ensayo está diseñado para su uso con la rata. Si los parámetros especificados en el presente método de ensayo se investigan en otra especie de roedor, habrá que justificarlo minuciosamente. En el programa internacional de validación de la detección de alteradores endocrinos en las directrices de ensayo TG 407 de la OCDE (correspondientes al capítulo B.7 del presente anexo), la única especie utilizada fue la rata. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías del desarrollo. Han de utilizarse animales vírgenes sanos, no sometidos a experimentación previa. Deben especificarse la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales utilizados en el ensayo. Al empezar el estudio, la variación del peso de los animales utilizados ha de ser mínima y no exceder del ± 20 % del peso medio de cada sexo. Cuando el estudio se realice como fase preliminar de un estudio a largo plazo o de una generación completa, es preferible que en ambos estudios se utilicen animales de la misma cepa y de la misma fuente.

**Alojamiento y alimentación de los animales**

16. Todos los procedimientos serán conformes a las normas habituales de cuidado de los animales de laboratorio. El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). Aunque la humedad relativa debe ser del 30 % como mínimo y preferiblemente no superar el 70 %, excepto durante la limpieza del animalario, el objetivo debe ser el 50-60 %. La iluminación debe ser artificial, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia problema si se administra por este método.

17. Los animales deben alojarse en pequeños grupos del mismo sexo; pueden alojarse de forma individual si está científicamente justificado. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de cinco animales en cada jaula. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Las hembras gestantes deben enjaularse de forma individual y disponer de materiales de nidificación. Las hembras en período de lactancia deben enjaularse de forma individual con sus crías.

18. Se debe analizar regularmente la comida para detectar posibles contaminantes. Se conservará una muestra de la dieta hasta el momento de concluir el informe.

**Preparación de los animales**

19. Se reparten al azar animales adultos jóvenes y sanos entre los grupos tratados y los grupos testigo. Las jaulas se deben disponer de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

**Preparación de las dosis**

20. Se recomienda administrar el producto problema oralmente, a menos que se consideren más adecuadas otras vías de administración. Cuando se selecciona la vía oral, el producto problema suele administrarse por sonda; sin embargo, los productos problema pueden administrarse alternativamente con el alimento o el agua de bebida.

▼M8

21. En caso necesario, el producto problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o emulsión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. Si se emplean vehículos distintos del agua, deben conocerse sus características tóxicas. Debe determinarse la estabilidad y homogeneidad del producto problema en el vehículo.

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

22. Se recomienda que cada grupo comience con un mínimo de 10 machos y entre 12 y 13 hembras. Las hembras se evaluarán antes de la exposición en relación con el ciclo estral y no se incluirán en el estudio los animales que no presenten ciclos típicos de 4 a 5 días; por lo tanto, se recomienda añadir más hembras para conseguir 10 hembras por grupo. Excepto en el caso de efectos tóxicos marcados, se espera que de esta forma se consigan al menos 8 hembras gestantes por grupo, que normalmente es el número mínimo aceptable de hembras gestantes por grupo. El objetivo es conseguir suficientes gestaciones y descendientes para garantizar una evaluación significativa del potencial del producto problema para afectar a la fertilidad, gestación, comportamiento materno y lactante, y al crecimiento y desarrollo de los descendientes $F_1$, desde la concepción hasta 13 días después del parto.

**Posología**

23. Deben utilizarse generalmente como mínimo tres grupos de ensayo y un grupo testigo. Las dosis pueden basarse en la información procedente de ensayos de toxicidad aguda o en los resultados de estudios de administración continuada. A excepción de la administración del producto problema, los animales del grupo testigo deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Si se utiliza un vehículo para administrar el producto problema, el grupo testigo debe recibir el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.

24. Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta los eventuales datos existentes sobre toxicidad y (toxico)cinética disponibles. También debe tenerse en cuenta que puede haber diferencias de sensibilidad entre los animales gestantes y los no gestantes. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos pero sin llegar a la muerte ni a un sufrimiento intenso. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar le eventual relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos observados (NOAEL) con la dosis inferior. Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos para establecer los niveles descendentes y frecuentemente es preferible añadir un cuarto grupo de ensayo antes que utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo con un factor superior a 10) entre dosis.

25. Si se observan signos de toxicidad general (por ejemplo, peso corporal reducido, efectos hepáticos, cardíacos, pulmonares o renales, etc.) u otras alteraciones que no son necesariamente respuestas tóxicas (por ejemplo, ingesta de alimentos reducida, hiperplasia hepática), habrá que interpretar con prudencia los efectos observados sobre los parámetros sensibles endocrinos.

**Ensayo límite**

26. Si en un estudio oral en el que se administra una sola dosis de al menos 1 000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración en la comida o en el agua de bebida, en el que se utiliza un porcentaje equivalente en los alimentos o el agua de bebida, siguiendo los procedimientos descritos en este estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente afines, no debiera esperarse la aparición de toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con varias dosis diferentes. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis oral superior. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas del producto problema las que determinan la concentración máxima que puede alcanzarse.

▼M8

**Administración del producto problema**

27. El producto problema se administra diariamente a los animales durante 7 días a la semana. Si el producto problema se administra por sonda, debe hacerse en una dosis única y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse en una sola vez depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de productos problema irritantes o corrosivos, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo con las diferentes dosis.

28. En el caso de productos problema administrados con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades administradas de producto problema no interfieren con la nutrición normal ni con el equilibrio hídrico. Cuando el producto problema se administre con el alimento, se puede utilizar una concentración alimentaria constante (ppm) o bien una dosis constante por unidad de peso corporal de los animales; debe indicarse qué alternativa se ha seguido. Si el producto problema se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a una hora similar, y ajustarse al menos una vez por semana para mantener una dosis constante respecto al peso corporal del animal.

**Calendario del experimento**

29. La administración del producto a ambos sexos debe comenzar al menos dos semanas antes del apareamiento, una vez que se han aclimatado durante al menos cinco días y las hembras han sido sometidas a cribado para confirmar que sus ciclos estrales son normales (en un período de dos semanas antes del tratamiento). El estudio debe programarse de tal manera que la evaluación del ciclo estral comience pronto después de que los animales hayan alcanzado la madurez sexual completa. Esto puede variar ligeramente según las diferentes cepas de ratas en distintos laboratorios; por ejemplo, en las ratas Sprague Dawley corresponde a 10 semanas de edad y en las ratas Wistar a unas 12 semanas de edad. Las madres con descendencia deben sacrificarse el día 13 después del parto, o poco después. El día del nacimiento (es decir, cuando se completa el parto) se define como el día 0 después del parto. Las hembras que no presentan signos de apareamiento se sacrifican entre 24 y 26 días después del último día del período de apareamiento. Se continúa la administración del producto problema a los dos sexos durante el período de apareamiento. Los machos deben seguir recibiendo el producto problema después del período de apareamiento, al menos hasta que se haya completado el período mínimo total de tratamiento de 28 días. A continuación se les da muerte o, alternativamente, se conservan y se les sigue administrando el producto para la posible realización de un segundo apareamiento si se considera adecuado.

30. La administración diaria del producto problema a las hembras parentales debe mantenerse a lo largo de toda la gestación y, como mínimo, hasta el día 13 después del parto o el día anterior al sacrificio, inclusive. En los estudios en que el producto problema se administre por inhalación o por vía cutánea, esta administración debe continuar como mínimo hasta el día 19 de la gestación, inclusive, y debe volver a iniciarse lo antes posible y, a más tardar, el día posnatal (DPN) 4.

31. En el apéndice 2 figura un diagrama del programa experimental.

**Procedimiento del apareamiento**

32. Normalmente, en este estudio deben utilizarse apareamientos 1: 1 (un macho con una hembra). Pueden darse excepciones en caso de muertes ocasionales de machos. Se recomienda colocar a la hembra con el mismo macho hasta que se observen signos de apareamiento o hayan transcurrido dos semanas. Las hembras deben examinarse cada mañana para determinar la presencia de esperma o de tapón vaginal. El día 0 de la gestación se define como el día en que se confirman los signos de apareamiento (se observa la presencia de un tapón vaginal o de esperma). Si no tiene éxito el apareamiento, puede plantearse otro intento de aparear hembras con machos de comprobada capacidad reproductora del mismo grupo.

▼M8

**Tamaño de la camada**

33. El día 4 después del nacimiento, podrá ajustarse el tamaño de cada camada eliminando las crías excedentarias mediante selección aleatoria con el fin de obtener, en la medida de lo posible, cuatro o cinco crías por sexo y por camada en función del tamaño normal de la camada en la cepa de ratas utilizada. Se deben tomar muestras de sangre de dos de las crías excedentarias; tales muestras se mezclan y se utilizan para determinar los niveles de T4 en el suero. No es adecuado eliminar crías de forma selectiva, por ejemplo sobre la base del peso corporal o la distancia anogenital (DAG). Cuando el número de crías machos o hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro o cinco de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (por ejemplo, seis machos y cuatro hembras). No se eliminará ninguna cría cuando el tamaño de la camada descienda por debajo del objetivo de la eliminación (8 o 10 crías/camada). Si solo se dispone de una única cría por encima del objetivo de la eliminación, solo se eliminará una cría, que se utilizará para la extracción de sangre con el fin de efectuar la posible evaluación de T4 en el suero.

34. Si no se ajusta el tamaño de la camada, se sacrifican dos crías por camada el día 4 después del nacimiento y se toman muestras de sangre para medir las concentraciones de la hormona tiroidea en el suero. Si es posible, las dos crías por camada deben ser hembras, a fin de reservar las crías macho para las evaluaciones del mantenimiento de pezones, salvo en caso de que la eliminación de estas crías no deje hembras suficientes para la evaluación en el momento del sacrificio. No se eliminarán las crías cuando el tamaño de la camada descienda por debajo de 8 o 10 crías/camada (dependiendo del tamaño normal de la camada en la cepa de ratas utilizada). Si solo se dispone de una única cría por encima del tamaño normal de la camada, solo se eliminará una cría, que se utilizará para la extracción de sangre con el fin de efectuar la posible evaluación de T4 en el suero.

**OBSERVACIONES EN VIVO**

*Observaciones clínicas*

35. Durante todo el ensayo, deben hacerse observaciones clínicas generales al menos una vez al día, y con mayor frecuencia cuando se observen signos de toxicidad. Deben hacerse preferentemente a la misma hora u horas cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se deben registrar los cambios de conducta pertinentes, los signos de parto difícil o prolongado y todos los signos de toxicidad, incluida la mortalidad. Estos registros deben incluir el momento de aparición, el grado y la duración de los signos de toxicidad.

*Peso corporal y consumo de alimento y agua*

36. Los machos y las hembras deben pesarse el primer día de la administración del producto problema, después al menos una vez por semana, y en el momento del sacrificio. Durante la gestación, las hembras deben pesarse en los días 0, 7, 14 y 20 y dentro de las 24 horas siguientes al parto (día 0 o 1 después del parto) y al menos en los días 4 y 13 después del parto. Estas observaciones se registran respecto a cada animal adulto por separado.

37. Durante el período previo al apareamiento, la gestación y la lactancia, el consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. La medición del consumo de alimentos durante el apareamiento es opcional. El consumo de agua durante estos períodos también debe medirse si el producto problema se administra a través del agua de bebida.

*Ciclos estrales*

38. Deben supervisarse los ciclos estrales antes de que se inicie el tratamiento, a fin de seleccionar para el estudio las hembras con ciclos regulares (véase el punto 22). También hay que efectuar un seguimiento diario de los frotis vaginales desde el principio del período de tratamiento hasta que se observen signos de apareamiento. Si hay preocupación por que los efectos del estrés

▼M8

agudo puedan modificar los ciclos estrales con el inicio de la administración del producto, los laboratorios pueden exponer a los animales de ensayo durante 2 semanas, hacer a continuación frotis vaginales diarios para supervisar el ciclo estral durante un mínimo de dos semanas durante el período previo al apareamiento, y continuar la supervisión en el período de apareamiento hasta que haya signos de apareamiento. En el momento de la obtención de las células de la vagina o del cuello del útero, hay que tener cuidado para evitar la alteración de la mucosa, que podría provocar una pseudogestación (7) (8).

*Parámetros de los descendientes*

39. Debe registrarse la duración de la gestación y calcularse a partir del día 0 de la gestación. Cada camada debe examinarse lo antes posible después del parto para determinar el número y sexo de las crías, los mortinatos, los nacidos vivos y los nacidos con retraso evidente (crías que sean significativamente menores que las crías testigo correspondientes) y la presencia de anomalías macroscópicas.

40. Las crías vivas deben contarse y clasificarse por sexo, y las camadas pesarse dentro de las 24 horas siguientes al parto (día 0 o 1 después del parto) y al menos en los días 4 y 13 después del parto. Además de las observaciones descritas en el punto 35, debe registrarse cualquier eventual comportamiento anómalo de la descendencia.

41. La distancia anogenital (DAG) de cada cría debe medirse el mismo día postnatal, entre el DPN 0 y el DPN 4. El peso corporal de las crías debe tomarse el día en que se mida la DAG y esta DAG se debe normalizar en función de una medida del tamaño de las crías, de preferencia la raíz cúbica del peso corporal (9). El número de pezones/areolas en las crías macho debe contarse el DPN 12 o 13, según lo recomendado en el documento de orientaciones GD 151 de la OCDE (10).

**Bioquímica clínica**

42. Se toman muestras de sangre de un lugar definido sobre la base del siguiente calendario:

— de al menos dos crías por camada el día 4 después del parto, si el número de crías lo permite (véanse los puntos 33-34),

— de todas las madres y al menos dos crías por camada, en el momento del sacrificio el día 13, y

— de todos los machos adultos, en el momento del sacrificio.

Todas las muestras de sangre se conservan en condiciones adecuadas. Las muestras de sangre de las crías del día 13 y las de los machos adultos se evalúan en cuanto a los niveles de hormonas tiroideas en suero (T4). Si procede, se lleva a cabo una evaluación adicional de la T4 en las muestras de sangre de las madres y de las crías del día 4. Como opción pueden medirse otras hormonas si son pertinentes. La sangre de las crías puede ponerse en común por camadas para efectuar los análisis de hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas (T4 y TSH) deben medirse preferentemente como «total».

43. Los siguientes factores pueden influir en la variabilidad y en el valor absoluto de las concentraciones hormonales:

— el momento del sacrificio, debido a la variación diurna de las concentraciones hormonales,

— el método de sacrificio, que se escogerá para evitar a los animales un sufrimiento indebido que pueda influir en las concentraciones hormonales,

— los equipos de ensayo para la determinación de las hormonas, que pueden presentar diferencias en sus curvas patrón.

▼M8

44. Las muestras de plasma destinadas específicamente a la determinación de las hormonas deben obtenerse a una hora comparable del día. Las cifras obtenidas al analizar las concentraciones de hormonas varían con los equipos comerciales de ensayo que se usan para el análisis.

**Anatomía patológica**

*Autopsia macroscópica*

45. En el momento del sacrificio o de la muerte en el transcurso del estudio, los animales adultos deben someterse a un examen macroscópico para detectar los eventuales cambios patológicos o anomalías. Se debe prestar especial atención a los órganos sexuales. Debe registrarse el número de puntos de implantación. Deben examinarse frotis vaginales en la mañana del día de la autopsia para determinar la fase del ciclo estral y poder establecer una correlación con el examen histopatológico de los ovarios.

46. Los testículos y epidídimos, así como la próstata y las vesículas seminales con las glándulas coagulantes en conjunto, de todos los machos adultos deben limpiarse de los tejidos adherentes, según proceda, y su peso húmedo debe tomarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Además, el peso de órganos opcionales podría incluir el complejo del músculo elevador del ano y el músculo bulbocavernoso, las glándulas de Cowper y el glande del pene en los machos y los ovarios emparejados (peso húmedo) y el útero (incluido el cuello) en las hembras; si se incluyen, estos pesos deben tomarse lo antes posible tras la disección.

47. Las crías muertas y las crías sacrificadas el día 13 después del parto, o poco después, deben, al menos, ser examinadas externamente de forma detenida para detectar la eventual presencia de anomalías macroscópicas. Debe prestarse especial atención a los órganos genitales externos, en los que debe estudiarse la eventual presencia de signos de alteración en el desarrollo. El día 13 debe tomarse y conservarse la glándula tiroidea de 1 cría macho y 1 cría hembra por camada.

48. Se deben conservar los ovarios, testículos, órganos sexuales secundarios (útero y cuello, epidídimos, próstata, vesículas seminales más glándulas coagulantes), glándula tiroidea y todos los órganos que muestren lesiones macroscópicas de todos los animales adultos. No se recomienda la fijación con formol para el examen sistemático de testículos y epidídimos. Un método aceptable es el uso del fijador de Bouin o el de Davidson modificado para estos tejidos (11). Con una aguja se puede puncionar suave y superficialmente la túnica albugínea por ambos polos del órgano para permitir la rápida penetración del fijador.

*Examen histopatológíco*

49. Se debe realizar un examen histológico detallado de los ovarios, testículos y epidídimos (con especial énfasis en las fases de espermatogénesis e histopatología de la estructura celular testicular intersticial) de los animales del grupo de dosis más elevada y del grupo testigo. En caso necesario, podrán examinarse los demás órganos conservados, incluida la glándula tiroidea de las crías y de los animales adultos. El peso de la glándula tiroidea puede determinarse después de su fijación. Su disección debe hacerse también de manera muy cuidadosa y solo después de la fijación para evitar daños tisulares, ya que estos podrían comprometer el examen histopatológico. El examen debe ampliarse a los animales de otros grupos de tratamiento si se observan cambios en el grupo que ha recibido la dosis mayor. El documento de orientación sobre histopatología (11) proporciona más información acerca de la disección, fijación, sección e histopatología de los tejidos endocrinos.

▼M8

DATOS E INFORME

**Datos**

50. Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, todos los datos deben resumirse en forma de cuadro que recoja, respecto a cada grupo de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o del sacrificio compasivo, el número de animales fértiles, el número de hembras gestantes, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de cambios histopatológicos y todos los datos pertinentes sobre la camada. En el apéndice 3 figura un modelo de informe resumido en forma de cuadro que ha demostrado ser muy útil para la evaluación del efecto sobre la reproducción y el desarrollo.

51. Debido a las dimensiones limitadas del estudio, los análisis estadísticos en forma de ensayos de «significación» tienen un valor limitado respecto a muchos parámetros, especialmente a los de la reproducción. Si se utilizan análisis estadísticos, entonces el método elegido debe ser apropiado para la distribución de la variable examinada, y ser seleccionado antes de que se inicie el estudio. El análisis estadístico de la DAG y del mantenimiento de pezones debe basarse en los datos de cada cría, teniendo en cuenta los efectos de camada. Cuando proceda, la camada es la unidad de análisis. El análisis estadístico del peso corporal de las crías debe basarse en los datos de cada cría, teniendo en cuenta el tamaño de la camada. Debido a lo reducido del tamaño del grupo, la utilización de datos históricos de control (por ejemplo, sobre el tamaño de la camada), en su caso, también puede ser útil como ayuda para la interpretación del estudio.

**Evaluación de los resultados**

52. Los resultados de este estudio de toxicidad deben evaluarse en términos de efectos observados, autopsia y resultados microscópicos. La evaluación debe referirse a la relación entre la dosis de producto problema y la presencia o ausencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluyendo lesiones macroscópicas, órganos diana identificados, esterilidad, anomalías clínicas, alteración del comportamiento reproductor y con la prole, cambios del peso corporal, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico.

53. Debido al breve período de tratamiento de los machos, el examen histopatológico de los testículos y epidídimos debe tenerse en cuenta junto con los datos de fertilidad, al evaluar los efectos para la reproducción masculina. También puede ser útil como ayuda para la interpretación del estudio el uso de datos de controles históricos sobre reproducción o desarrollo (por ejemplo, en cuanto al tamaño de la camada, DAG, mantenimiento de pezones, niveles séricos de T4), cuando se disponga de ellos.

54. Por motivos de control de calidad, se propone recopilar los datos de los controles históricos y calcular los coeficientes de variación de los datos numéricos, especialmente en cuanto a los parámetros relacionados con la detección de alteradores endocrinos. Estos datos se pueden usar con fines de comparación al evaluar los estudios actuales.

**Informe del ensayo**

55. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

— estabilidad del producto problema, si se conoce.

▼**M8**

Sustancias de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Vehículo (si procede):*

— justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

*Animales de ensayo:*

— especie y cepa empleada;

— número, edad y sexo de los animales;

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;

— peso de cada animal al inicio del ensayo;

— justificación de la especie si es distinta de la rata.

*Condiciones del ensayo:*

— justificación de la selección de las dosis;

— datos sobre la formulación del producto problema o su preparación con los alimentos, concentraciones obtenidas, estabilidad y homogeneidad del preparado;

— datos sobre la administración del producto problema;

— factor de conversión de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede;

— datos de la calidad de los alimentos y el agua;

— descripción detallada del procedimiento de aleatorización de la selección de crías para el sacrificio, en su caso.

*Resultados:*

— peso corporal y variaciones del mismo;

— consumo de alimentos y de agua, si se ha medido;

— datos de la respuesta tóxica por sexo y dosis, incluida la fertilidad, la gestación y cualquier otro signo de toxicidad;

— duración de la gestación;

— efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la descendencia, el crecimiento postnatal, etc.;

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no);

— número de hembras adultas con ciclo estral normal y anormal y duración del ciclo;

— número de nacidos vivos y de pérdidas postimplantatorias;

— datos sobre el peso corporal de las crías;

— DAG de todas las crías (y peso corporal el día de la medición de la DAG);

▼M8

— mantenimiento de pezones en las crías macho;

— niveles de la hormona tiroidea, en machos adultos y crías el día 13 (y madres y crías el día 4 si se miden);

— número de crías con anomalías visibles macroscópicamente, evaluación macroscópica de los genitales externos, número de nacidos con retraso evidente;

— momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido hasta el sacrificio;

— número de implantes, tamaño de la camada y pesos de la camada en el momento del registro;

— peso corporal en el momento del sacrificio y peso de los órganos de los animales parentales;

— observaciones de la autopsia;

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos;

— datos relativos a la absorción (si procede);

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

*Discusión de los resultados.*

*Conclusiones.*

**Interpretación de los resultados**

56. El estudio pretende evaluar la toxicidad para la reproducción o el desarrollo relacionada con la administración continuada de dosis (véanse los puntos 5 y 6). Podría dar una indicación de la necesidad de realizar nuevas investigaciones y proporciona orientaciones para el diseño de estudios posteriores. Debe consultarse el documento de orientación n.º 43 de la OCDE para obtener ayuda en la interpretación de los resultados de toxicidad para la reproducción y el desarrollo (12). El documento de orientación n.º 106 de la OCDE sobre la evaluación histológica de los ensayos endocrinos y de reproducción en roedores (11) proporciona información sobre la preparación y evaluación de los órganos (endocrinos) y los frotis vaginales que puede ser útil para las presentes directrices de ensayo.

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Disponible previa solicitud a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Disponible previa solicitud a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(3) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998. Disponible previa solicitud a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(4) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(5) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations. Series on Testing and Assessment, (No 19), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, París.

▼**M8**

(6) OCDE (2011). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment(No 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(7) Goldman, J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M. and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, Birth Defects Research, Part B, 80 (2), 84-97.

(8) Sadleir R.M.F.S (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, Nueva York.

(9) Gallavan R.H. Jr, Holson J.F., Stump D.G., Knapp J.F. and Reynolds V.L.(1999). Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights, Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(10) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(11) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 106), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(12) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES [VÉASE TAMBIÉN EL DOCUMENTO DE ORIENTACIONES GD 150 DE LA OCDE (6)]

Androgenicidad: Capacidad de un producto para actuar como una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiandrogenicidad: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiestrogenicidad: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17ß-estradiol) en el organismo de un mamífero.

Actividad antitiroidea: Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona tiroidea natural (por ejemplo, $T_{3)}$ en el organismo de un mamífero.

Producto: Sustancia o mezcla.

Toxicidad para el desarrollo: Manifestación de la toxicidad para la reproducción que consiste en la presencia de trastornos pre-, peri- y posnatales, de tipo estructural o funcional, en la descendencia.

Posología: Término general que abarca la dosis administrada, y la frecuencia y duración de la administración.

Dosis: Cantidad de producto problema administrada. La dosis se expresa en peso del producto problema por unidad de peso corporal de animal de ensayo y día (p. ej., mg/kg peso corporal/día), o como concentración alimentaria constante.

Toxicidad evidente: Término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de un producto problema. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del peligro y tales que, ante un aumento de la dosis administrada, quepa esperar como resultado la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.

Disminución de la fertilidad: Trastornos en la capacidad o las funciones reproductoras de las hembras o de los machos.

Toxicidad para la madre: Efectos adversos en las hembras gestantes, tanto si se producen de forma específica (efecto directo) como inespecífica (efecto indirecto).

NOAEL: Abreviatura en inglés de nivel sin efectos adversos observados (*no-observed-adverse effect level*). Se trata de la dosis más elevada a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

Estrogenicidad: Capacidad de un producto para actuar como una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17ß-estradiol) en el organismo de un mamífero.

Toxicidad para la reproducción: Efectos nocivos para la descendencia y/o disminución de la capacidad o las funciones reproductoras de las hembras y de los machos.

Producto problema: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

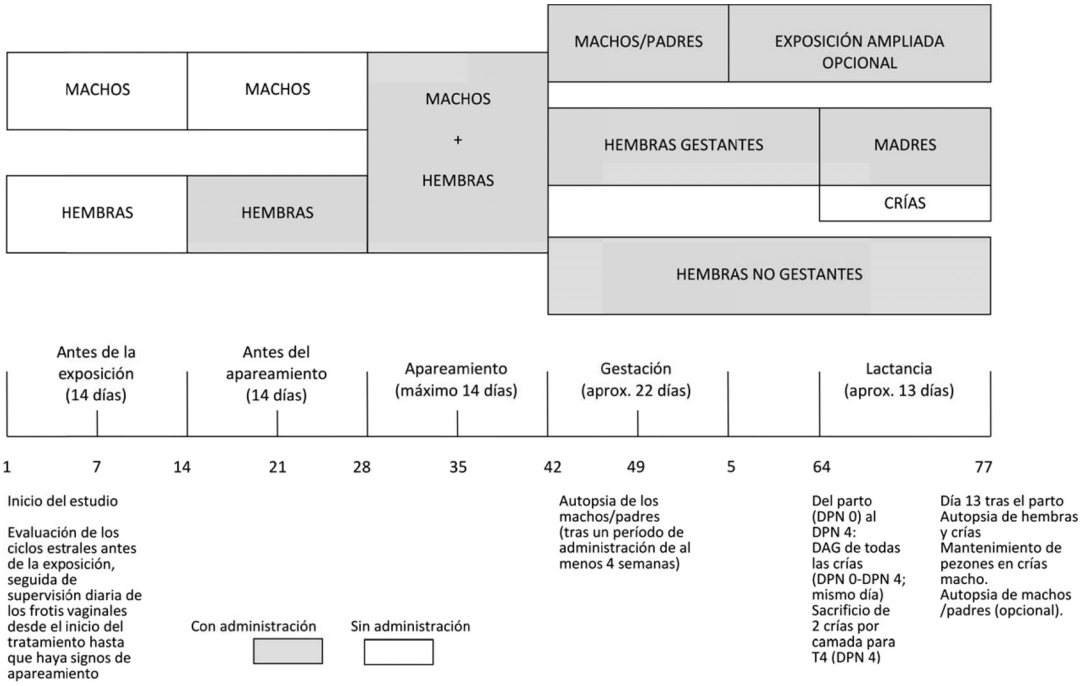
Actividad tiroidea: Capacidad de un producto para actuar como una hormona tiroidea natural (por ejemplo, $T_{3)}$ en el organismo de un mamífero.

Validación: Procedimiento científico diseñado para caracterizar las exigencias y limitaciones operativas de un método de ensayo y demostrar su fiabilidad y pertinencia para un fin particular.

▼**M8**

*Apéndice 2*

DIAGRAMA DEL PROGRAMA EXPERIMENTAL CON INDICACIÓN DE LA DURACIÓN MÁXIMA DEL ESTUDIO, SOBRE LA BASE DE UN PERÍODO DE APAREAMIENTO COMPLETO DE CATORCE DÍAS



▼**M8**

*Apéndice 3*

INFORME RESUMIDO EN FORMA DE CUADRO SOBRE LOS EFECTOS PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

| OBSERVACIONES | VALORES | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Dosis (unidades) | 0 (testigo) | … | … | … | … |
| Parejas al inicio (N) | | | | | |
| Ciclo estral (por lo menos, longitud media y frecuencia de ciclos irregulares) | | | | | |
| Hembras que presentan signos de cópula (N) | | | | | |
| Hembras que llegan a la gestación (N) | | | | | |
| Días de concepción 1-5 (N) | | | | | |
| Días de concepción 6-...( [1])) (N) | | | | | |
| Gestación ≤ 21 días (N) | | | | | |
| Gestación = 22 días (N) | | | | | |
| Gestación ≥ 23 días (N) | | | | | |
| Madres con crías nacidas vivas (N) | | | | | |
| Madres con crías vivas el día 4 después del parto (N) | | | | | |
| Implantes/madre (media) | | | | | |
| Crías vivas/madre en el momento del nacimiento (media) | | | | | |
| Crías vivas/madre el día 4 (media) | | | | | |
| Proporción de sexos (m/f) en el momento del nacimiento (media) | | | | | |
| Proporción de sexos (m/f) el día 4 (media) | | | | | |
| Peso de la camada al nacer (media) | | | | | |
| Peso de la camada el día 4 (media) | | | | | |
| Peso de las crías al nacer (media) | | | | | |
| Peso de las crías en el momento de la medición de la DAG (media de los machos, media de las hembras) | | | | | |

▼**M8**

| OBSERVACIONES | VALORES | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Dosis (unidades) | 0 (testigo) | … | … | … | … |
| DAG de las crías en el mismo día posnatal, nacimiento – día 4 (media de los machos, media de las hembras, indíquese el DPN) | | | | | |
| Peso de las crías el día 4 (media) | | | | | |
| Mantenimiento de pezones en las crías macho al día 13 (media) | | | | | |
| Peso de las crías el día 13 (media) | | | | | |
| **CRÍAS ANÓMALAS** | | | | | |
| Madres con 0 | | | | | |
| Madres con 1 | | | | | |
| Madres con ≥ 2 | | | | | |
| **PÉRDIDA DE DESCENDENCIA** | | | | | |
| **Prenatal tras el implante (implantes menos nacimientos vivos)** | | | | | |
| Hembras con 0 | | | | | |
| Hembras con 1 | | | | | |
| Hembras con 2 | | | | | |
| Hembras con ≥ 3 | | | | | |
| **Posnatal (nacidos vivos menos vivos el día 13 posnatal)** | | | | | |
| Hembras con 0 | | | | | |
| Hembras con 1 | | | | | |
| Hembras con 2 | | | | | |
| Hembras con ≥ 3 | | | | | |

([1]) Último día del período de apareamiento.

▼M8

## B.64. ESTUDIO DE TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUADA COMBINADO CON EL ENSAYO DE CRIBADO DE TOXICIDAD PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 422 de la OCDE (2016). Las directrices de la OCDE sobre los ensayos de productos se revisan periódicamente a la luz del progreso científico,. Las directrices de ensayo de cribado TG 422 originales se adoptaron en 1996 sobre la base de un protocolo de un «Estudio de toxicidad por administración continuada combinado con el ensayo de cribado de toxicidad para la reproducción o el desarrollo», debatido en dos reuniones de expertos, celebradas en Londres en 1990 (1) y en Tokio en 1992 (2).

2. El presente método de ensayo combina una parte de cribado de la toxicidad para la reproducción o el desarrollo que se basa en la experiencia adquirida en los Estados miembros a partir de la utilización del método original con productos existentes de alto volumen de producción y en ensayos exploratorios con sustancias testigo positivo (3) (4), así como una parte de toxicidad por administración continuada, en concordancia con las directrices de ensayo TG 407 de la OCDE [estudio de toxicidad oral por administración continuada (28 días) en roedores, correspondiente al capítulo B.7 del presente anexo].

3. Este método de ensayo se ha actualizado con parámetros pertinentes de alteración endocrina, como continuación de la actividad prioritaria iniciada en 1998 en la OCDE para revisar las directrices de ensayo vigentes y elaborar nuevas directrices de ensayo para el cribado y el ensayo de los alteradores endocrinos potenciales (5). En este contexto, las TG 407 (correspondiente al capítulo B.7 del presente anexo) se mejoraron en 2008 mediante parámetros adecuados para detectar la actividad endocrina de los productos problema. El objetivo de la actualización de las directrices de ensayo TG 422 era incluir algunos parámetros relevantes de alteración endocrina en las directrices de ensayo de cribado, en las que los períodos de exposición cubren algunos de los períodos sensibles durante el desarrollo (periodos prenatal y posnatal inicial).

4. En las directrices de ensayo TG 422 se incluyeron los parámetros adicionales pertinentes de alteración endocrina seleccionados, que también forman parte de las directrices TG 443 (Estudio ampliado de toxicidad para la reproducción en una generación, correspondiente al capítulo B.56 del presente anexo), sobre la base de un estudio de viabilidad sobre cuestiones científicas y técnicas relacionadas con su inclusión, así como las posibles adaptaciones del diseño del ensayo necesarias para su inclusión (6).

5. El presente método de ensayo está diseñado para generar información limitada sobre los efectos de un producto problema en el comportamiento reproductor de los machos y de las hembras, tales como la actividad gonadal, el comportamiento relativo al apareamiento, la concepción, el desarrollo del embrión y el parto. No es una alternativa ni sustituye a los métodos de ensayo existentes B.31, B.34, B.35 o B.56.

### CONSIDERACIONES INICIALES

6. Al determinar y evaluar las características tóxicas de un producto problema, el estudio de la toxicidad oral por administración continuada puede estar indicado cuando la información inicial relativa a la toxicidad se haya obtenido mediante ensayos de toxicidad aguda. Este estudio proporciona información sobre los posibles peligros para la salud que pueden derivarse de la exposición continuada durante un período de tiempo relativamente limitado. El método describe el estudio básico de toxicidad por administración continuada que puede aplicarse en el caso de productos para los que no está justificado un estudio de 90 días (por ejemplo, cuando el volumen de producción no supera ciertos límites), o bien como estudio preliminar de un estudio de toxicidad a largo plazo. Al realizar el estudio, deben aplicarse los principios y consideraciones básicos recogidos en el documento de orientación n.º 19 de la OCDE sobre el reconocimiento, evaluación y utilización de los signos clínicos como parámetros de tratamiento compasivo para los animales de experimentación empleados en las evaluaciones de la seguridad (7).

▼**M8**

7. Además, incluye un ensayo de cribado de la toxicidad para la reproducción y el desarrollo y, por tanto, también puede utilizarse para proporcionar información inicial sobre los posibles efectos en el comportamiento reproductivo de los machos y las hembras, tales como la función gonadal, el comportamiento relativo al apareamiento, la concepción, el desarrollo del embrión y el parto, sea en una fase temprana de la evaluación de las propiedades toxicológicas de los productos problema o sea con los productos problema preocupantes. El presente método de ensayo no proporciona información completa sobre todos los aspectos de la reproducción y el desarrollo. En particular, solo ofrece medios limitados para detectar las manifestaciones postnatales de una exposición prenatal, o los efectos que puedan inducirse durante la exposición posnatal. Debido (entre otras razones) a la selectividad de los criterios de valoración y a la corta duración del estudio, este método no aporta pruebas para hacer alegaciones definitivas de efectos nulos sobre la reproducción o el desarrollo. Por otra parte, a falta de datos de otros ensayos de toxicidad para la reproducción o el desarrollo, los resultados positivos son útiles para la evaluación inicial del peligro y contribuyen a la adopción de decisiones con respecto a la necesidad y el calendario de ensayos adicionales.

8. Los resultados obtenidos por medio de parámetros endocrinos deben contemplarse en el contexto del «Marco conceptual para el estudio y la evaluación de los alteradores endocrinos» (*Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals*) de la OCDE (8). En este Marco conceptual, las directrices TG 422 mejoradas de la OCDE figuran en el nivel 4 como ensayo *in vivo* que proporciona datos sobre los efectos adversos relativos a los parámetros endocrinos pertinentes. Sin embargo, una señal endocrina podría no considerarse prueba suficiente por sí misma de que el producto problema es un alterador endocrino.

9. El método de ensayo insiste más en los efectos neurológicos como parámetro específico, y destaca la necesidad de hacer observaciones clínicas atentas de los animales, a fin de obtener la máxima información posible. El método debe detectar los productos con potencial neurotóxico, y respecto a los que pueda justificarse la realización de investigaciones más profundas de este aspecto. Además, el método puede dar también una indicación básica de los efectos inmunológicos.

10. A falta de datos de otros estudios de toxicidad sistémica, de toxicidad para la reproducción o el desarrollo, de neurotoxicidad o de inmunotoxicidad, los resultados positivos son útiles para la evaluación inicial del peligro y contribuyen a la adopción de decisiones con respecto a la necesidad y el calendario de ensayos adicionales. El ensayo puede ser especialmente útil como parte de la serie de datos de información de examen (SIDS, *Screening Information Data Set*) de la OCDE para la evaluación de los productos existentes respecto a los que se dispone de escasa o nula información toxicológica y pueden servir como alternativa a la realización de dos ensayos aparte, uno de la toxicidad por administración continuada (TG 407 de la OCDE, correspondientes al capítulo B.7 del presente anexo) y otro de la toxicidad para la reproducción o el desarrollo (TG 421 de la OCDE, correspondientes al capítulo B.63 del presente anexo). También puede utilizarse como estudio de determinación del intervalo de dosis para estudios más amplios sobre la reproducción o el desarrollo, o en cualquier otro caso que se considere pertinente.

11. En general, se supone que existen diferencias de sensibilidad entre los animales gestantes y los no gestantes. Por consiguiente, puede ser más complicado determinar qué dosis son adecuadas para evaluar tanto la toxicidad general sistémica como la toxicidad específica para la reproducción o el desarrollo en esta combinación de ensayos que cuando se realizan por separado los distintos ensayos. Por otra parte, la interpretación de los resultados de los ensayos con respecto a la toxicidad sistémica general puede ser más difícil que cuando se realiza un estudio aparte de administración continuada, especialmente si los parámetros séricos y de histopatología no se evalúan al mismo tiempo en el estudio. Debido a estas complejidades técnicas, se

▼M8

requiere una considerable experiencia con los ensayos de toxicidad para la realización de este ensayo de cribado combinado. Por otra parte, aparte del menor número de animales implicados, el ensayo combinado puede ofrecer un medio mejor de discriminar los efectos directos sobre la reproducción o el desarrollo frente a los que son secundarios a otros efectos (sistémicos).

12. En este ensayo, el período de administración es más largo que en un estudio de administración continuada de 28 días. Sin embargo, utiliza menos animales de cada sexo por grupo en comparación con la situación en la que se lleva a cabo un estudio clásico de administración continuada de de 28 días además de un ensayo de cribado de la toxicidad para la reproducción o el desarrollo.

13. En este método de ensayo se parte de la administración oral del producto problema. Es posible que se requieran modificaciones si se utilizan otras vías de exposición.

14. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

15. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

16. Se administra el producto problema en dosis escalonadas a varios grupos de machos y hembras. Los machos deben recibir el producto durante un mínimo de cuatro semanas, hasta el día anterior al sacrificio programado (incluido dicho día), lo que comprende un mínimo de dos semanas antes del apareamiento, el período de apareamiento y, aproximadamente, dos semanas después del apareamiento. Teniendo en cuenta lo limitado del período de administración a los machos antes del apareamiento, la fertilidad puede no ser un indicador particularmentesensible de la toxicidad testicular. Por lo tanto, es esencial un examen histológico detallado de los testículos. Para permitir la detección de la mayor parte de los efectos sobre la fertilidad masculina y la espermatogénesis, se considera suficiente la combinación de un período de administración antes del apareamiento de dos semanas y, posteriormente, observaciones sobre el apareamiento y la fertilidad, con un período de administración total de al menos cuatro semanas, seguido de un examen histopatológico detallado de las gónadas masculinas.

17. Las hembras deben recibir el producto problema a lo largo de todo el estudio. Se incluyen aquí dos semanas antes del apareamiento (con el objetivo de abarcar por lo menos dos ciclos estrales completos), el período de tiempo variable hasta la concepción, la duración de la gestación y al menos trece días después del parto, hasta el día anterior al sacrifico programado, inclusive.

18. La duración del estudio, tras la aclimatación y la evaluación del ciclo estral antes de la administración del producto problema, depende del comportamiento de las hembras y es de aproximadamente 63 días, [14 días como mínimo antes del apareamiento, (hasta) 14 días de apareamiento, 22 días de gestación y 13 días de lactancia].

19. A lo largo del período de administración, se observa a los animales todos los días atentamente con el fin de descubrir la posible aparición de signos de toxicidad. Se practica la autopsia a los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo y, al final del mismo, se sacrifican y someten a autopsia los animales supervivientes.

▼M8

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Selección de la especie animal**

20. Este método de ensayo está diseñado para su uso con la rata. Si los parámetros especificados en estas directrices de ensayo TG 422 se investigan en otra especie de roedor, habrá que justificarlo minuciosamente. En el programa internacional de validación de la detección de alteradores endocrinos en relación con las directrices de ensayo TF 407, la única especie utilizada fue la rata. Debe evitarse la utilización de cepas que presenten un bajo índice de fertilidad o una incidencia notoriamente elevada de anomalías del desarrollo. Han de utilizarse animales vírgenes sanos, no sometidos a experimentación previa. Deben especificarse la especie, la cepa, el sexo, el peso y la edad de los animales utilizados en el ensayo. Al principio del experimento, la diferencia de peso entre los animales empleados ha de ser mínima y no superar el ± 20 % del peso medio de cada sexo. Cuando el estudio se realice como fase preliminar de un estudio a largo plazo o de una generación completa, es preferible que en ambos estudios se utilicen animales de la misma cepa y de la misma fuente.

**Alojamiento y alimentación de los animales**

21. Todos los procedimientos serán conformes a las normas habituales del cuidado de los animales de laboratorio. El local de los animales de experimentación ha de estar a una temperatura de 22 °C (± 3 °C). La humedad relativa debe ser como mínimo del 30 % y preferentemente no superar el 70 %, salvo durante la limpieza del local. La iluminación debe ser artificial, con un fotoperíodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación se podrán utilizar dietas de laboratorio convencionales, con suministro ilimitado de agua para beber. La elección de la dieta puede verse influida por la necesidad de garantizar una mezcla conveniente de la sustancia problema si se administra por este método.

22. Los animales deben alojarse en pequeños grupos del mismo sexo; pueden alojarse de forma individual si está científicamente justificado. En caso de que se utilicen jaulas colectivas, no habrá más de cinco animales en cada jaula. El apareamiento debe llevarse a cabo en jaulas adecuadas al efecto. Las hembras gestantes deben enjaularse de forma individual y disponer de materiales de nidificación. Las hembras en período de lactancia deben enjaularse de forma individual con sus crías.

23. Se debe analizar regularmente la comida para detectar posibles contaminantes. Se conservará una muestra de la dieta hasta el momento de concluir el informe.

**Preparación de los animales**

24. Se eligen al azar animales adultos jóvenes y sanos, y se asignan a las jaulas y grupos tratados. Las jaulas se deben disponer de forma que se reduzcan al mínimo los posibles efectos debidos al enjaulamiento. Se identifica a los animales de forma unívoca y se los mantiene en las jaulas al menos cinco días antes de empezar el estudio para que se acostumbren a las condiciones de laboratorio.

**Preparación de las dosis**

25. Se recomienda administrar el producto problema oralmente a menos que se consideren más adecuadas otras vías de administración. Cuando se selecciona la vía oral, el producto problema suele administrarse por sonda; sin embargo, los productos problema también pueden administrarse alternativamente con el alimento o el agua de bebida.

26. En caso necesario, el producto problema se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. Se recomienda considerar en primer lugar, siempre que sea posible, el uso de una solución o suspensión acuosa, después el uso de una solución o suspensión oleosa (por ejemplo, en aceite de maíz) y, por último, la posible disolución en otros vehículos. En caso de vehículos no acuosos, deben conocerse sus características tóxicas. Debe determinarse la estabilidad y homogeneidad del producto problema en el vehículo.

▼M8

PROCEDIMIENTO

**Número y sexo de los animales**

27. Se recomienda que cada grupo comience con un mínimo de 10 machos y entre 12 y 13 hembras. Las hembras se evaluarán antes de la exposición en relación con el ciclo estral y no se incluirán en el estudio los animales que no presenten ciclos típicos de 4 a 5 días; por lo tanto, se recomienda añadir más hembras para conseguir 10 hembras por grupo. Excepto en el caso de efectos tóxicos marcados, se espera que de esta forma se consigan al menos 8 hembras gestantes por grupo, que normalmente es el número mínimo aceptable de hembras gestantes por grupo. El objetivo es conseguir suficientes gestaciones y descendientes para garantizar una evaluación significativa del potencial del producto problema para afectar a la fertilidad, gestación, comportamiento materno y lactante, y al crecimiento y desarrollo de los descendientes $F_1$, desde la concepción hasta 13 días después del parto. Si se van a sacrificar animales durante el experimento, habrá que añadir el número de animales que se haya previsto sacrificar antes de acabar el estudio. Debe estudiarse la conveniencia de utilizar un grupo satélite adicional de cinco animales por sexo en los grupos testigo y de dosis más elevada para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos tóxicos sistémicos, al menos durante los 14 días siguientes al tratamiento. Los animales de los grupos satélite no se aparean y, por consiguiente, no se utilizan para la evaluación de la toxicidad para la reproducción o el desarrollo.

**Posología**

28. Deben utilizarse generalmente como mínimo tres grupos de ensayo y un grupo testigo. Si no se dispone de datos generales apropiados sobre la toxicidad, puede realizarse un estudio (con animales de la misma cepa y procedencia) para ayudar a determinar las dosis que deben emplearse. A excepción de la administración del producto problema, los animales del grupo testigo deben tratarse de la misma manera que los de los grupos de ensayo. Si se utiliza un vehículo para administrar el producto problema, el grupo testigo debe recibir el mayor volumen utilizado de dicho vehículo.

29. Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta los eventuales datos existentes sobre toxicidad y (toxico)cinética disponibles. También debe tenerse en cuenta que puede haber diferencias de sensibilidad entre los animales gestantes y los no gestantes. La dosis más elevada debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos pero sin llegar a la muerte ni a un sufrimiento evidente. Posteriormente, debe seleccionarse una secuencia descendente de dosis destinadas a demostrar la eventual relación dosis-respuesta y la ausencia de efectos adversos con la dosis inferior. Los intervalos del doble al cuádruple suelen ser óptimos y a menudo es preferible añadir un cuarto grupo de ensayo en lugar de utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, con un factor superior a 10) entre dosis.

30. Si se observan signos de toxicidad general (por ejemplo, peso corporal reducido, efectos hepáticos, cardíacos, pulmonares o renales, etc.) u otras alteraciones que no son necesariamente respuestas tóxicas (por ejemplo, ingesta de alimentos reducida, hiperplasia hepática), habrá que interpretar con prudencia los efectos observados sobre los parámetros sensibles endocrinos.

**Ensayo límite**

31. Si un estudio oral con una sola dosis de, al menos, 1 000 mg/kg peso corporal/día o, en caso de administración con los alimentos, de un porcentaje equivalente en los alimentos o el agua de bebida (según las determinaciones del peso corporal), siguiendo los procedimientos descritos en el presente estudio, no se produce ningún efecto tóxico observable y si, a partir de datos de sustancias estructuralmente afines, no debiera esperarse la aparición de

▼M8

toxicidad, puede considerarse innecesario realizar un estudio completo con varias dosis. El ensayo límite es válido excepto cuando la exposición humana indique la necesidad de utilizar una dosis superior. Si se trata de otras vías de administración, como la inhalación o la aplicación cutánea, suelen ser las características fisicoquímicas del producto problema las que determinan la exposición máxima que puede alcanzarse.

**Administración del producto problema**

32. El producto problema se administra diariamente a los animales durante 7 días a la semana. Si el producto problema se administra por sonda, debe hacerse en una dosis única y con una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen máximo de líquido que puede administrarse en una sola vez depende del tamaño del animal utilizado. Dicho volumen no debe superar 1 ml/100 g de peso corporal, salvo en el caso de las soluciones acuosas, en que puede llegarse a 2 ml/100 g de peso corporal. Salvo en el caso de productos problema irritantes o corrosivos, que por lo general producen efectos exacerbados con concentraciones mayores, deberá reducirse al mínimo la variabilidad del volumen de ensayo ajustando la concentración de manera que el volumen sea el mismo con las diferentes dosis.

33. En el caso de productos problema administrados con los alimentos o el agua de bebida, es importante cerciorarse de que las cantidades administradas de producto problema no interfieren con la nutrición normal ni con el equilibrio hídrico. Cuando el producto problema se administre con el alimento, se puede utilizar una concentración alimentaria constante (ppm) o bien una dosis constante por unidad de peso corporal de los animales; debe indicarse qué alternativa se ha seguido. Si el producto problema se administra por sonda, la dosis debe darse todos los días a una hora similar, y ajustarse al menos una vez por semana para mantener una dosis constante respecto al peso corporal del animal. Cuando el estudio combinado se utilice como fase preliminar de un ensayo de toxicidad a largo plazo o de un estudio completo de toxicidad para la reproducción, en ambos estudios deberá utilizarse una dieta similar.

**Calendario del experimento**

34. La administración del producto a ambos sexos debe comenzar dos semanas antes del apareamiento, una vez que se han aclimatado durante al menos cinco días y las hembras han sido sometidas a cribado para confirmar que sus ciclos estrales son normales (en un período de dos semanas antes del tratamiento). El estudio debe programarse de tal manera que la evaluación del ciclo estral comience pronto después de que los animales hayan alcanzado la madurez sexual completa. Esto puede variar ligeramente según las diferentes cepas de ratas en distintos laboratorios; por ejemplo, en las ratas Sprague Dawley corresponde a 10 semanas de edad y en las ratas Wistar a unas 12 semanas de edad. Las madres con descendencia deben sacrificarse el día 13 después del parto, o poco después. A fin de permitir el ayuno desde la víspera de las madres antes de la recogida de sangre (si se prefiere esta opción), no es necesario dar muerte a las madres y a sus descendientes el mismo día. El día del nacimiento (es decir, cuando se completa el parto) se define como el día 0 después del parto. Las hembras que no presentan signos de apareamiento se sacrifican entre 24 y 26 días después del último día del período de apareamiento. Se continúa la administración del producto problema a los dos sexos durante el período de apareamiento. Los machos deben seguir recibiendo el producto problema después del período de apareamiento, al menos hasta que se haya completado el período mínimo total de tratamiento de 28 días. A continuación se les da muerte o, alternativamente, se conservan y se les sigue administrando el producto para la posible realización de un segundo apareamiento si se considera adecuado.

35. La administración diaria del producto problema a las hembras parentales debe mantenerse a lo largo de toda la gestación y, como mínimo, hasta el día 13 después del parto o el día anterior al sacrificio, inclusive. En los estudios en que el producto problema se administre por inhalación o por vía cutánea, esta administración debe continuar como mínimo hasta el día 19 de la gestación, inclusive, y debe volver a iniciarse lo antes posible y, a más tardar, el día posnatal (DPN) 4.

▼M8

36. No se aparean los animales del eventual grupo satélite previsto para las observaciones de seguimiento. Deben mantenerse al menos 14 días después del primer sacrificio programado de las madres, sin tratamiento alguno, para detectar la aparición retardada, la persistencia o la recuperación de los efectos tóxicos.

37. En el apéndice 2 figura un diagrama del programa experimental.

**Ciclos estrales**

38. Deben supervisarse los ciclos estrales antes de que se inicie el tratamiento, a fin de seleccionar para el estudio las hembras con ciclos regulares (véase el punto 27). También hay que efectuar un seguimiento diario de los frotis vaginales desde el principio del período de tratamiento hasta que se observen signos de apareamiento. Si hay preocupación por que los efectos del estrés agudo puedan modificar los ciclos estrales con el inicio de la administración del producto, los laboratorios pueden exponer a los animales de ensayo durante 2 semanas, hacer a continuación frotis vaginales diarios para supervisar el ciclo estral durante un mínimo de dos semanas durante el período previo al apareamiento, y continuar la supervisión en el período de apareamiento hasta que haya signos de apareamiento. En el momento de la obtención de las células de la vagina o del cuello del útero, hay que tener cuidado para evitar la alteración de la mucosa, que podría provocar una pseudogestación (8) (9).

**Procedimiento del apareamiento**

39. Normalmente, en este estudio deben utilizarse apareamientos 1: 1 (un macho con una hembra). Pueden darse excepciones en caso de muertes ocasionales de machos. Se recomienda colocar a la hembra con el mismo macho hasta que se observen signos de apareamiento o hayan transcurrido dos semanas. Las hembras deben examinarse cada mañana para determinar la presencia de esperma o de tapón vaginal. El día 0 de la gestación se define como el día en que se confirman los signos de apareamiento (se observa la presencia de un tapón vaginal o de esperma). Si no ha tenido éxito el apareamiento, puede plantearse otro intento de aparear hembras con machos de comprobada capacidad reproductora del mismo grupo.

**Tamaño de la camada**

40. El día 4 después del nacimiento, podrá ajustarse el tamaño de cada camada eliminando las crías excedentarias mediante selección aleatoria con el fin de obtener, en la medida de lo posible, cuatro o cinco crías por sexo y por camada en función del tamaño normal de la camada en la cepa de ratas utilizada. Se deben tomar muestras de sangre de dos de la crías excedentarias; tales muestras se mezclan y se utilizan para determinar los niveles de T4 en el suero. No es adecuado eliminar crías de forma selectiva, por ejemplo sobre la base del peso corporal o la distancia anogenital (DAG). Cuando el número de crías machos o hembras impida lograr que cada camada cuente con cuatro o cinco de cada sexo, es aceptable una adaptación parcial (por ejemplo, seis machos y cuatro hembras). No se eliminará ninguna cría cuando el tamaño de la camada descienda por debajo del objetivo de la eliminación (8 o 10 crías/camada). Si solo se dispone de una única cría por encima del objetivo de la eliminación, solo se eliminará una cría, que se utilizará para la extracción de sangre con el fin de efectuar la posible evaluación de T4 en el suero.

41. Si no se ajusta el tamaño de la camada, se sacrifican dos crías por camada el día 4 después del nacimiento y se toman muestras de sangre para medir las concentraciones de la hormona tiroidea en el suero. Si es posible, las dos crías por camada deben ser hembras, a fin de reservar las crías macho para las evaluaciones del mantenimiento de pezones, salvo en caso de que la eliminación de estas crías no deje hembras suficientes para la evaluación en el momento del sacrificio. No se eliminarán las crías cuando el tamaño de la camada descienda por debajo de 8 o 10 crías/camada (dependiendo del tamaño normal de la camada en la cepa de ratas utilizada). Si solo se dispone de una única cría por encima del tamaño normal de la camada, solo se eliminará una cría, que se utilizará para la extracción de sangre con el fin de efectuar la posible evaluación de T4 en el suero.

▼M8

**Observaciones**

42. Debe hacerse una observación clínica general al menos una vez al día, preferentemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos previstos tras la administración. Se debe registrar el estado de salud de los animales. Se observan todos los animales al menos dos veces el día en relación con la morbilidad y la mortalidad.

43. Todos los animales parentales deben someterse a una observación clínica exhaustiva antes de la primera exposición (para permitir realizar comparaciones con un mismo sujeto) y, después, al menos a una por semana. Estas observaciones deben hacerse fuera de la jaula de alojamiento en un ambiente normal y, de preferencia, a la misma hora cada día. Deben registrarse cuidadosamente, de preferencia con sistemas de puntuación definidos expresamente por el laboratorio de ensayo. Debe procurarse que las variaciones en las condiciones de ensayo sean mínimas y que las observaciones sean realizadas de preferencia por observadores ajenos al tratamiento. Los signos observados deben incluir, sin ánimo de exhaustividad, los cambios de la piel, pelo, ojos, mucosas, la presencia de secreciones y excreciones y la actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala). Deben registrarse también los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, o estereotipados (por ejemplo, realización excesiva de movimientos de limpieza o recorridos circulares repetitivos), los partos prolongados o difíciles, o los comportamientos anómalos (automutilación, marcha hacia atrás, etc.) (10).

44. En un momento del estudio, deben llevarse a cabo, en cinco machos y cinco hembras seleccionados aleatoriamente de cada grupo, una evaluación de la reactividad sensorial a estímulos de diferentes modalidades (p. ej., estímulos auditivos, visuales y propioceptivos) (8) (9) (11), una evaluación de la fuerza de prensión (12) y una evaluación de la actividad motriz (13). En las referencias respectivas se da más información sobre los procedimientos que pueden seguirse. Sin embargo, también pueden utilizarse procedimientos alternativos a los citados. En los machos, estas observaciones funcionales deben realizarse hacia el final del período de administración del producto, poco antes del sacrificio programado, pero antes del muestreo de sangre para hematología o bioquímica clínica (véanse los puntos 53-56, incluida la nota a pie de página 1). Las hembras deben estar en un estado fisiológico similar durante estas pruebas funcionales y deben someterse a ensayo preferentemente una vez durante la última semana de lactancia (p. ej. DL 6-13), poco antes del sacrificio programado. En la medida de lo posible, han de reducirse al mínimo los tiempos de separación de las madres y las crías.

45. Las observaciones funcionales realizadas una vez hacia la finalización del estudio pueden omitirse cuando el estudio se realice como estudio preliminar de un estudio posterior de toxicidad subcrónica (90 días) o a largo plazo. En este caso, las observaciones funcionales deberán incluirse en este estudio de continuación. Por otra parte, la disponibilidad de datos sobre las observaciones funcionales en este estudio de administración continuada puede facilitar la selección de las dosis utilizadas en un estudio posterior sobre toxicidad subcrónica o a largo plazo.

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

47. Debe registrarse la duración de la gestación y calcularse a partir del día 0 de la gestación. Cada camada debe examinarse lo antes posible después del parto para determinar el número y sexo de las crías, los mortinatos, los nacidos vivos y los nacidos con retraso evidente (crías que sean significativamente menores que las crías testigo correspondientes), y la presencia de anomalías macroscópicas.

▼M8

48. Las crías vivas deben contarse y clasificarse por sexo, y las camadas pesarse dentro de las 24 horas siguientes al parto (día 0 o 1 después del parto) y al menos en los días 4 y 13 después del parto. Además de las observaciones sobre los animales parentales (véanse los puntos 43 y 44), debe registrarse cualquier eventual comportamiento anómalo de la descendencia.

49. La distancia anogenital (DAG) de cada cría debe medirse el mismo día posnatal, entre el DPN 0 y el DPN 4. El peso corporal de las crías debe recogerse el día en que se mida la DAG y esta DAG se debe normalizar en función de una medida del tamaño de las crías, de preferencia la raíz cúbica del peso corporal (14). El número de pezones/areolas en las crías macho debe contarse el DPN 12 o 13, según lo recomendado en el documento de orientaciones GD 151 de la OCDE (15).

**Peso corporal y consumo de alimento y agua**

50. Los machos y las hembras deben pesarse el primer día de la administración del producto problema, después al menos una vez por semana, y en el momento del sacrificio. Durante la gestación, las hembras deben pesarse en los días 0, 7, 14 y 20 y dentro de las 24 horas siguientes al parto (día 0 o 1 después del parto) y al menos en los días 4 y 13 después del parto. Estas observaciones se registran respecto a cada animal adulto por separado.

51. Durante el período previo al apareamiento, la gestación y la lactancia, el consumo de alimentos debe medirse al menos semanalmente. La medición del consumo de alimentos durante el apareamiento es opcional. El consumo de agua durante estos períodos también debe medirse si el producto problema se administra a través del agua de bebida.

**Hematología**

52. Una vez durante el estudio, deben practicarse los siguientes exámenes hematológicos con cinco machos y cinco hembras seleccionados aleatoriamente de cada grupo: hematocrito, concentraciones de hemoglobina, recuento de eritrocitos, reticulocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y medida del tiempo o capacidad de coagulación sanguínea. Si se sabe o sospecha que el producto problema o sus posibles metabolitos tienen propiedades oxidantes, habrá que determinar además la concentración de metahemoglobina y los corpúsculos de Heinz.

53. Las muestras de sangre deben tomarse de un sitio designado. Durante el muestreo, las hembras deben estar en un estado fisiológicamente similar. A fin de evitar dificultades prácticas relacionadas con la variabilidad en cuanto al principio de la gestación, la recogida de sangre de las hembras puede hacerse al final del período anterior al apareamiento como alternativa al muestreo justo antes del procedimiento de sacrificio de los animales, o como parte de este. Las muestras de sangre de los machos deben tomarse preferentemente justo antes del procedimiento de sacrificio de los animales, o como parte de este. Otra posibilidad es recoger la sangre de los machos al final del período previo a la apareamiento cuando se haya preferido este punto para las hembras.

54. Las muestras de sangre deben conservarse en condiciones adecuadas.

**Bioquímica clínica**

55. Las determinaciones de bioquímica clínica para investigar los principales efectos tóxicos en los tejidos y, en concreto, en el riñón y el hígado, deben realizarse con muestras de sangre obtenidas de los cinco machos y cinco

▼M8

hembras seleccionados de cada grupo. Se recomienda que los animales estén en ayunas desde el día anterior a la toma de muestras ([1]). Los parámetros medidos en el plasma o del suero deben incluir las concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albúminas, al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina-transaminasa, aspartato-transaminasa y sorbitol-deshidrogenasa) y ácidos biliares. La determinación de otras enzimas (de origen hepático o no) y de la bilirrubina puede proporcionar información útil en ciertas circunstancias.

56. Se toman muestras de sangre de un lugar definido sobre la base del siguiente calendario:

— de al menos dos crías por camada el día 4 después del parto, si el número de crías lo permite (véanse los puntos 40-41),

— de todas las madres y al menos dos crías por camada en el momento del sacrificio el día 13, y

— de todos los machos adultos, en el momento del sacrificio.

Todas las muestras de sangre se conservan en condiciones adecuadas. Las muestras de sangre de las crías del día 13 y las de los machos adultos se evalúan en cuanto a los niveles de hormonas tiroideas en suero (T4). Si procede, se lleva a cabo una evaluación adicional de la T4 en las muestras de sangre de las madres y de las crías del día 4. Como opción pueden medirse otras hormonas si son pertinentes. La sangre de las crías puede ponerse en común por camadas para efectuar los análisis de hormonas tiroideas. Las hormonas tiroideas (T4 y TSH) deben medirse preferentemente como «total».

57. Pueden realizarse, con carácter opcional, las siguientes determinaciones en los análisis de orina de cinco machos seleccionados aleatoriamente de cada grupo durante la última semana del estudio utilizando la recogida programada de orina; aspecto, volumen, osmolalidad o densidad, pH, contenido en proteínas, glucosa, sangre y glóbulos sanguíneos.

58. Además de ello, debe plantearse el estudio de los marcadores séricos de lesiones tisulares generales. Entre las otras determinaciones que deben realizarse si se sabe o sospecha que las propiedades conocidas del producto problema pueden afectar a las características metabólicas correspondientes se incluyen las concentraciones de calcio, fosfato, triglicéridos en ayunas y glucosa en ayunas, hormonas específicas, metahemoglobina y colinesterasa. Debe decidirse caso por caso si se procede a estas determinaciones.

59. Los siguientes factores pueden influir en la variabilidad y en el valor absoluto de las concentraciones hormonales:

— el momento del sacrificio, debido a la variación diurna de las concentraciones hormonales,

([1]) El ayuno desde la víspera es preferible para realizar ciertos análisis en el suero y el plasma, sobre todo para la determinación de glucosa. La razón principal es que el aumento de la variabilidad que provocaría necesariamente la toma de alimentos podría enmascarar efectos más sutiles y dificultar la interpretación. Por otra parte, sin embargo, el ayuno desde la víspera puede interferir con el metabolismo general de los animales (gestantes), alterar el período y el comportamiento de la lactancia, y, en particular en estudios de alimentación, puede alterar la exposición diaria al producto problema. Si se adopta el ayuno desde la víspera, deben realizarse análisis de bioquímica clínica después de la realización de las observaciones funcionales en la cuarta semana del estudio en el caso de los machos. Las madres deben mantenerse un día más después de retirar las crías, por ejemplo el DPN 13). Las madres deben tenerse en ayunas durante una noche desde el día de lactancia 13-14 y la sangre final debe utilizarse para medir los parámetros de bioquímica clínica.

▼M8

— el método de sacrificio, que se escogerá para evitar a los animales un sufrimiento indebido que pueda influir en las concentraciones hormonales,

— los equipos de ensayo para la determinación de las hormonas, que pueden presentar diferencias en sus curvas patrón.

60. Las muestras de plasma destinadas específicamente a la determinación de las hormonas deben obtenerse a una hora comparable del día. Las cifras obtenidas al analizar las concentraciones de hormonas varían con los equipos comerciales de ensayo que se usan para el análisis.

61. Si los datos de referencia previos son insuficientes, habrá que considerar la posible determinación de los parámetros hematológicos y de bioquímica clínica antes de iniciar la administración o, preferentemente, con un conjunto de animales no incluidos en los grupos experimentales. En el caso de las hembras, los datos deben ser de animales lactantes.

ANATOMÍA PATOLÓGICA

**Autopsia macroscópica**

62. Debe practicarse una autopsia macroscópica completa y detallada a todos los animales adultos empleados en el estudio, que incluya un examen detenido de la superficie corporal externa, todos los orificios y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. Se debe prestar especial atención a los órganos sexuales. Debe registrarse el número de puntos de implantación. Deben examinarse frotis vaginales en el día de la autopsia para determinar la fase del ciclo estral y poder establecer una correlación con el examen histopatológico de los sexuales femeninos.

63. Los testículos y epidídimos, así como la próstata y las vesículas seminales con las glándulas coagulantes en conjunto, de todos los machos adultos deben limpiarse de los tejidos adherentes, según proceda, y su peso húmedo debe tomarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Además, el peso de órganos opcionales podría incluir el complejo de músculo elevador del ano y el músculo bulbocavernoso, las glándulas de Cowper y el glande del pene en los machos y los ovarios emparejados (peso húmedo) y el útero (incluido el cuello) en las hembras; si se incluyen, estos pesos deben recogerse lo antes posible tras la disección. Deben conservarse los ovarios, testículos, epidídimos, órganos sexuales secundarios y todos los órganos que muestren lesiones macroscópicas de todos los animales adultos.

64. Deben conservarse en el medio de fijación más adecuado para el examen histopatológico posterior previsto las glándulas tiroideas de todos los adultos machos y hembras y de una cría macho y una cría hembra del día 13 de cada camada. El peso de la glándula tiroidea puede determinarse después de su fijación. Su disección debe hacerse también de manera muy cuidadosa y solo después de la fijación para evitar daños tisulares. Los daños tisulares podrían comprometer el examen histopatológico. Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado, justo antes del procedimiento de sacrificio de los animales (o como parte de este procedimiento), y conservarse en condiciones adecuadas (véase el punto 56).

▼M8

65. Además, en el caso de un mínimo de cinco machos y hembras adultos, seleccionados aleatoriamente entre cada grupo (aparte de los moribundos o sacrificados antes de la terminación del estudio), el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, el timo, el bazo, el encéfalo y el corazón deben limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y debe medirse su peso húmedo lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Los tejidos que se enumeran a continuación deben conservarse en el medio de fijación más adecuado teniendo en cuenta tanto el tipo de tejido como el examen histopatológico posterior previsto: todas las lesiones macroscópicas, el encéfalo (regiones representativas, incluidos el cerebro, el cerebelo y la protuberancia), la médula espinal, los ojos, el estómago, el intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, el bazo, el corazón, el timo, la tráquea y los pulmones (conservados mediante distensión pulmonar confijador y después inmersión), las gónadas (testículos y ovarios), los órganos sexuales secundarios (útero con el cuello, epidídimos, próstata, vesículas seminales más glándulas coagulantes), la vagina, la vejiga urinaria, los ganglios linfáticos [además del ganglio de drenaje más proximal, debe tomarse otro ganglio linfático según la experiencia del laboratorio (16)], un nervio periférico (ciático o tibial) preferentemente muy próximo al músculo, músculo esquelético y hueso, con médula ósea (una sección o, como alternativa, un aspirado de médula ósea recién montado). Se recomienda fijar los testículos mediante inmersión en fijador de Bouin o en fijador de Davidson modificado (16) (17) (18); no se recomienda para estos tejidos la fijación con formol. Con una aguja se puede puncionar suave y superficialmente la túnica albugínea por ambos polos del órgano para permitir la rápida penetración del fijador. Las observaciones clínicas y de otro tipo pueden indicar la necesidad de examinar otros tejidos. Se conservará también cualquier otro órgano que se considere diana teniendo en cuenta las propiedades conocidas de la sustancia problema.

66. Los siguientes tejidos pueden proporcionar valiosas indicaciones sobre los efectos de carácter endocrino: gónadas (ovarios y testículos), órganos sexuales secundarios (útero con el cuello, epidídimos, vesículas seminales con glándulas coagulantes, próstata dorsolateral y ventral), vagina, hipófisis, glándula mamaria y glándula suprarrenal. Las alteraciones de las glándulas mamarias de machos no se han documentado suficientemente, pero este parámetro puede ser muy sensible a las sustancias dotadas de actividad estrogénica. La observación de órganos/tejidos que no se enumeran en el punto 65 es opcional.

67. Las crías muertas y las crías sacrificadas el día 13 después del parto, o poco después, deben, al menos, ser examinadas externamente de forma detenida para detectar la eventual presencia de anomalías macroscópicas. Debe prestarse especial atención a los órganos genitales externos, en los que debe estudiarse la eventual presencia de signos de alteración en el desarrollo.

**Examen histopatológíco**

68. Es preciso realizar un examen histopatológico completo de los órganos y tejidos conservados de los animales seleccionados en los grupos testigo y tratados con la dosis más elevada (haciendo especial hincapié en las fases de la espermatogénesis en las gónadas masculinas y en la histopatología de la estructura de las células intersticiales de los testículos). En caso necesario, podrán examinarse la glándula tiroidea de las crías y de los animales adultos restantes. En caso de que se hayan observado cambios relacionados con el tratamiento en el grupo con la dosis más elevada, estos exámenes se ampliarán a animales de otros grupos tratados. El documento de orientación sobre histopatología (10) proporciona más información acerca de la disección, fijación, sección e histopatología de los tejidos endocrinos.

69. Deben examinarse todas las lesiones macroscópicas. Para contribuir a la determinación de los NOAEL, deben examinarse los órganos diana en otros grupos tratados, especialmente en los grupos de los que se alega que muestran un NOAEL.

▼M8

70. Si se utiliza un grupo satélite, debe hacerse un examen histopatológico de los órganos y tejidos señalados por presentar efectos en los grupos tratados.

DATOS E INFORME

**Datos**

71. Los resultados de cada animal deben darse por separado. Además, todos los datos deben resumirse en forma de cuadro que recoja, respecto a cada grupo de ensayo, el número de animales al inicio del ensayo, el número de animales hallados muertos durante el mismo o sacrificados por razones compasivas, el momento de la muerte o del sacrificio compasivo, el número de animales fértiles, el número de hembras gestantes, el número de animales que presenten signos de toxicidad, una descripción de dichos signos (con inclusión del momento de su aparición, duración y gravedad), los tipos de cambios histopatológicos y todos los datos pertinentes sobre la camada. En el apéndice 3 figura un modelo de informe resumido en forma de cuadro, que ha demostrado ser muy útil para la evaluación de los efectos sobre la reproducción y el desarrollo.

72. Siempre que sea posible, los resultados numéricos deberán evaluarse mediante un método estadístico adecuado y comúnmente aceptado. La comparación del efecto a lo largo de un intervalo de dosis debe evitar el uso de múltiples pruebas t. Los métodos estadísticos deben seleccionarse durante el diseño del estudio. El análisis estadístico de la DAG y del mantenimiento de pezones debe basarse en los datos de cada cría, teniendo en cuenta los efectos de camada. Cuando proceda, la camada es la unidad de análisis. El análisis estadístico del peso corporal de las crías debe basarse en los datos de cada cría, teniendo en cuenta el tamaño de la camada. Debido a las dimensiones limitadas del estudio, los análisis estadísticos en forma de ensayos de «significación» tienen un valor limitado respecto a muchos parámetros, especialmente a los de la reproducción. Son inadecuados algunos de los métodos más utilizados, especialmente los ensayos paramétricos con medidas de tendencia central. Si se utilizan análisis estadísticos, entonces el método elegido debe ser apropiado para la distribución de la variable examinada y ser seleccionado antes de que se inicie el estudio.

**Evaluación de los resultados**

73. Los resultados de este estudio de toxicidad deben evaluarse en términos de efectos observados, autopsia y resultados microscópicos. La evaluación debe referirse a la relación entre la dosis de producto problema y la presencia o ausencia, incidencia y gravedad de las anomalías, incluyendo lesiones macroscópicas, órganos diana identificados, esterilidad, anomalías clínicas, alteración del comportamiento reproductor y con la prole, cambios del peso corporal, efectos sobre la mortalidad y cualquier otro efecto tóxico.

74. Debido al breve período de tratamiento de los machos, el examen histopatológico de los testículos y epidídimos debe tenerse en cuenta junto con los datos de fertilidad, al evaluar los efectos para la reproducción masculina. También puede ser útil como ayuda para la interpretación del estudio el uso de datos de controles históricos sobre reproducción o desarrollo (por ejemplo, en cuanto al tamaño de la camada, DAG, mantenimiento de pezones, niveles séricos de T4), cuando se disponga de ellos.

75. Por motivos de control de calidad, se propone recopilar datos de controles históricos y calcular coeficientes de variación de los datos numéricos, especialmente en cuanto a los parámetros relacionados con la detección de alteradores endocrinos. Estos datos se pueden usar con fines de comparación al evaluar los estudios actuales.

▼M8

**Informe del ensayo**

76. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

— estabilidad del producto problema, si se conoce.

Sustancias de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Vehículo (si procede):*

— Justificación de la elección del vehículo, si es distinto del agua.

*Animales de ensayo:*

— especie y cepa empleada;

— número, edad y sexo de los animales;

— origen, condiciones de alojamiento, dieta, etc.;

— peso de cada animal al inicio del ensayo;

— justificación de la especie si es distinta de la rata.

*Condiciones del ensayo:*

— justificación de la selección de las dosis;

— datos sobre la formulación de la sustancia problema o su preparación con los alimentos, concentración obtenida, estabilidad y homogeneidad del preparado;

— datos sobre la administración del producto problema;

— factor de conversión de la concentración (ppm) del producto problema en los alimentos o en el agua de bebida a dosis reales (mg/kg peso corporal/día), si procede;

— datos de la calidad de los alimentos y el agua;

— descripción detallada del procedimiento de aleatorización de la selección de crías para el sacrificio, en su caso.

*Resultados:*

— peso corporal y variaciones del mismo;

— consumo de alimentos y de agua, si se ha medido;

▼**M8**

— datos de la respuesta tóxica por sexo y dosis, incluida la fertilidad, la gestación y cualquier otro signo de

— toxicidad;

— duración de la gestación;

— efectos tóxicos o de otro tipo sobre la reproducción, la descendencia, el crecimiento postnatal, etc.;

— naturaleza, gravedad y duración de las observaciones clínicas (sean reversibles o no);

— evaluación de la actividad sensorial, de la fuerza de prensión y de la actividad motriz;

— pruebas hematológicas con los correspondientes valores de referencia;

— pruebas bioquímicas con los correspondientes valores de referencia;

— número de hembras adultas con ciclo estral normal y anormal y duración del ciclo;

— número de nacidos vivos y de pérdidas postimplantatorias;

— número de crías con anomalías visibles macroscópicamente; evaluación macroscópica de los genitales externos, número de nacidos con retraso evidente;

— momento de la muerte durante el ensayo o indicación de que los animales han sobrevivido hasta el sacrificio;

— número de implantes, tamaño de la camada y pesos de la camada en el momento del registro;

— datos sobre el peso corporal de las crías; DAG de todas las crías (y peso corporal el día de la medición de la DAG);

— mantenimiento de pezones en las crías macho;

— niveles de la hormona tiroidea, en machos adultos y crías el día 13 (y madres y crías el día 4 si se miden);

— peso corporal en el momento del sacrificio y peso de los órganos de los animales parentales;

— observaciones de la autopsia;

— descripción detallada de los hallazgos histopatológicos;

— datos relativos a la absorción (si procede);

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede.

*Discusión de los resultados.*

*Conclusiones.*

▼M8

**Interpretación de los resultados**

77. El estudio pretende evaluar la toxicidad para la reproducción o el desarrollo relacionada con la administración continuada de dosis. En particular, dado que el estudio se centra en parámetros tanto de toxicidad general como de toxicidad para la reproducción y el desarrollo, los resultados deben permitir distinguir los efectos sobre la reproducción y el desarrollo que se producen en ausencia de toxicidad general, frente a los que se manifiestan únicamente a dosis que también son tóxicas para los animales parentales (véanse los puntos 7-11). Podría dar una indicación de la necesidad de realizar nuevas investigaciones y proporcionar orientaciones para el diseño de estudios posteriores. Debe consultarse el documento de orientación n.º 43 de la OCDE para obtener ayuda en la interpretación de los resultados de toxicidad para la reproducción y el desarrollo (19). El documento de orientación n.º 106 de la OCDE sobre la evaluación histológica de los ensayos endocrinos y de reproducción en roedores (16) proporciona información sobre la preparación y evaluación de los órganos (endocrinos) y los frotis vaginales que puede ser útil para el presente método de ensayo.

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (1990). Room Document No 1 for the 14th Joint Meeting of the Chemicals Group and Management Committee. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(2) OCDE (1992). Chairman's Report of the ad hoc Expert Meeting on Reproductive Toxicity Screening Methods, Tokyo, 27th-29th October, 1992. Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(3) Mitsumori K., Kodama Y., Uchida O., Takada K., Saito M. Naito K., Tanaka S., Kurokawa Y., Usami, M., Kawashima K., Yasuhara K., Toyoda K., Onodera H., Furukawa F., Takahashi M. and Hayashi Y. (1994). Confirmation Study, Using Nitro-Benzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/ Developmental Toxicity Test Protocol Proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). J. *Toxicol*, Sci., 19, 141-149.

(4) Tanaka S., Kawashima K., Naito K., Usami M., Nakadate M., Imaida K., Takahashi M., Hayashi Y., Kurokawa Y. and Tobe M. (1992). Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test (OECD): Familiarization Using Cyclophosphamide. Fundam. Appl. *Toxicol*., 18, 89-95.

(5) OCDE (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, Available upon request at Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

(6) OCDE (2015). Feasibility Study for Minor Enhancements of TG 421/422 with ED Relevant Endpoints. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 217), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(7) OCDE (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluations, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 19), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

▼**M8**

(8) Goldman J.M., Murr A.S., Buckalew A.R., Ferrell J.M.and Cooper R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies, *Birth Defects Research*, Part B, 80 (2), 84-97.

(9) Sadleir R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, in Auston C.R. and Short R.V. (Eds.), Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, New York.

(10) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document (No 60).

(11) Moser V.C., McDaniel K.M. and Phillips P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol*. Appl. *Pharmacol*., 108, 267-283.

(12) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C. and Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. *Toxicol*., 1, 233-236.

(13) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H.A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13, 599-609.

(14) Gallavan R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds. (1999). «Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights», Reproductive Toxicology, 13: 383-390.

(15) OCDE (2013). Guidance Document in Support of the Test Guideline on the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 151). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(16) OCDE (2009). Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 106) Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(17) Hess RA and Moore BJ. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (Eds.). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52-85.

(18) Latendresse JR, Warbrittion AR, Jonassen H, Creasy DM. (2002). Fixation of Testes and Eyes Using a Modified Davidson's Fluid: Comparison with Bouin's Fluid and Conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol*. 30, 524-533.

(19) OCDE (2008). Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 43), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(20) OCDE (2011), Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption (No 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES (VÉASE TAMBIÉN EL DOCUMENTO DE ORIENTACIONES GD 150 DE LA OCDE) (20)

Androgenicidad Capacidad de un producto para actuar como una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiandrogenicidad Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona androgénica natural (por ejemplo, testosterona) en el organismo de un mamífero.

Antiestrogenicidad Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17ß-estradiol) en el organismo de un mamífero.

Actividad antitiroidea Capacidad de un producto para inhibir la acción de una hormona tiroidea natural (por ejemplo, $T_3$) en el organismo de un mamífero.

Producto: Sustancia o mezcla.

Toxicidad para el desarrollo Manifestación de la toxicidad para la reproducción que consiste en la presencia de trastornos pre-, peri- y posnatales, de tipo estructural o funcional, en la descendencia.

Dosis Cantidad de producto problema administrada. La dosis se expresa en peso del producto problema por unidad de peso corporal de animal de ensayo y día (p. ej., mg/kg peso corporal/día), o como concentración alimentaria constante.

Posología Término general que abarca la dosis administrada, y la frecuencia y duración de la administración.

Toxicidad evidente Término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de un producto problema. Estos signos deben ser suficientes para la evaluación del peligro y tales que, ante un aumento de la dosis administrada, quepa esperar como resultado la aparición de signos tóxicos graves y una mortalidad probable.

Disminución de la fertilidad Trastornos en la capacidad o las funciones reproductoras de las hembras o de los machos.

Toxicidad para la madre Efectos adversos en las hembras gestantes, tanto si se producen de forma específica (efecto directo) como inespecífica (efecto indirecto) y relacionados con la gestación.

NOAEL Abreviatura en inglés de nivel sin efectos adversos observados (*no-observed-adverse effect level*). Se trata de la dosis más elevada a la que no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento.

Estrogenicidad Capacidad de un producto para actuar como una hormona estrogénica natural (por ejemplo, 17ß-estradiol) en el organismo de un mamífero.

Toxicidad para la reproducción Efectos nocivos para la descendencia y/o disminución de la capacidad o las funciones reproductoras de las hembras y de los machos.

Producto problema Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

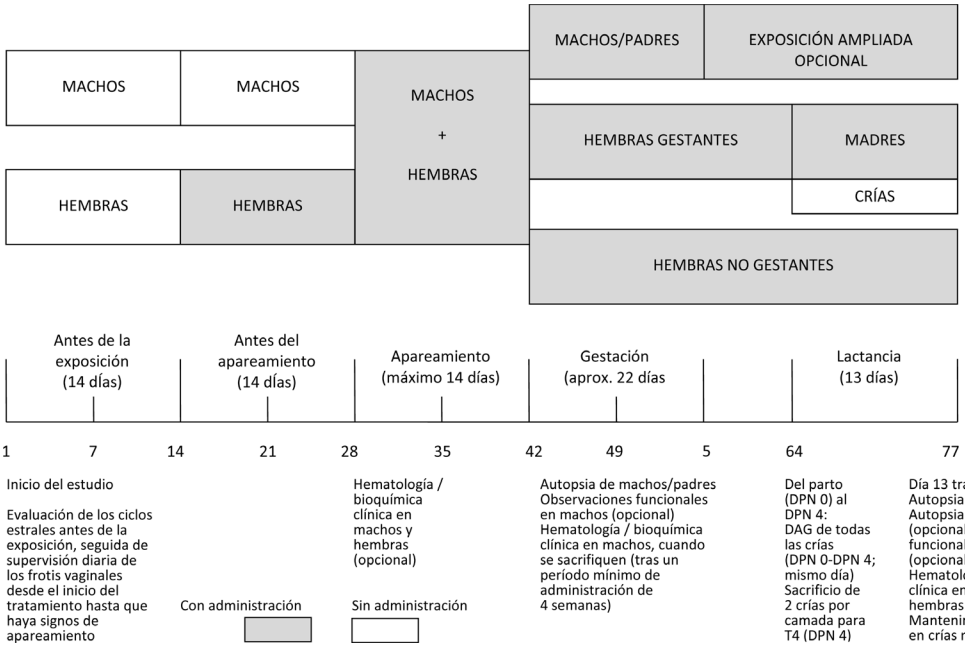
Actividad tiroidea Capacidad de un producto para actuar como una hormona tiroidea natural (por ejemplo, $T_3$) en el organismo de un mamífero.

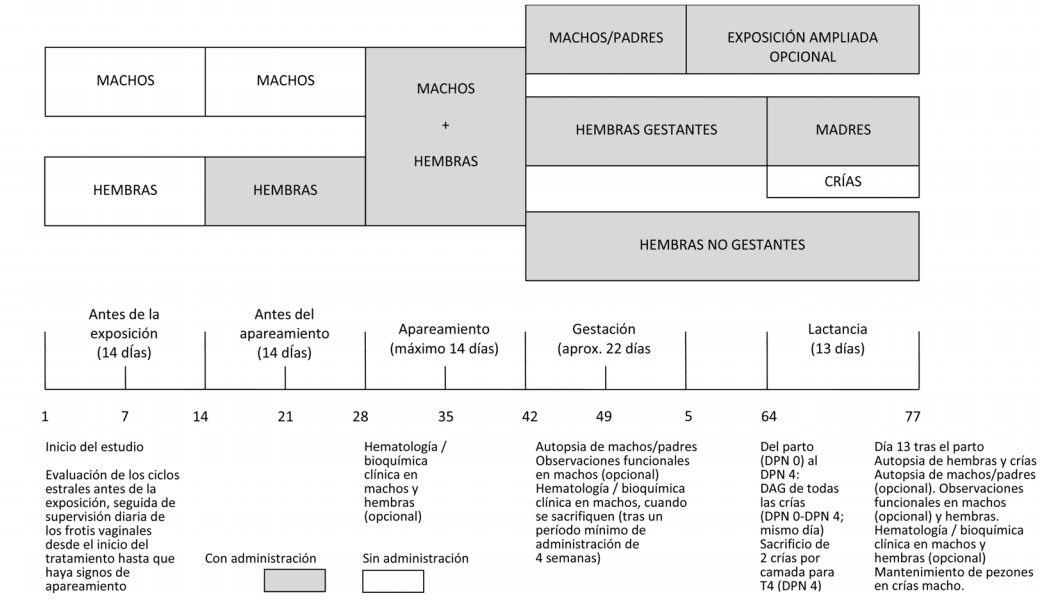
Validación Procedimiento científico diseñado para caracterizar las exigencias y limitaciones operativas de un método de ensayo y demostrar su fiabilidad y pertinencia para un fin particular.

▼**M8**

*Apéndice 2*

DIAGRAMA DEL PROGRAMA EXPERIMENTAL CON INDICACIÓN DE LA DURACIÓN MÁXIMA DEL ESTUDIO, SOBRE LA BASE DE UN PERÍODO DE APAREAMIENTO COMPLETO DE CATORCE DÍAS



▼**M8**

*Apéndice 3*

INFORME RESUMIDO EN FORMA DE CUADRO SOBRE LOS EFECTOS PARA LA REPRODUCCIÓN O EL DESARROLLO

| OBSERVACIONES | VALORES | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Dosis (unidades) …… | 0 (testigo) | … | … | … | … |
| Parejas al inicio (N) | | | | | |
| Ciclo estral (por lo menos, longitud media y frecuencia de los ciclos irregulares) | | | | | |
| Hembras que presentan signos de cópula (N) | | | | | |
| Hembras que llegan a la gestación (N) | | | | | |
| Días de concepción 1-5 (N) | | | | | |
| Días de concepción 6-. ..[1] (1)) (N) | | | | | |
| Gestación ≤ 21 días (N) | | | | | |
| Gestación = 22 días (N) | | | | | |
| Gestación ≥ 23 días (N) | | | | | |
| Madres con crías nacidas vivas (N) | | | | | |
| Madres con crías vivas el día 4 después del parto (N) | | | | | |
| Implantes/madre (media) | | | | | |
| Crías vivas/madre en el momento del nacimiento (media) | | | | | |
| Crías vivas/madre el día 4 (media) | | | | | |
| Proporción de sexos (m/f) en el momento del nacimiento (media) | | | | | |
| Proporción de sexos (m/f) el día 4 (media) | | | | | |
| Peso de la camada al nacer (media) | | | | | |
| Peso de la camada el día 4 (media) | | | | | |
| Peso de las crías al nacer (media) | | | | | |
| Peso de las crías en el momento de la medición de la DAG (media de los machos, media de las hembras) | | | | | |
| DAG de las crías en el mismo día posnatal, nacimiento – día 4 (media de los machos, media de las hembras, indíquese el DPN) | | | | | |
| Peso de las crías el día 4 (media) | | | | | |
| Peso de las crías el día 13 (media) | | | | | |

▼M8

| OBSERVACIONES | VALORES | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Mantenimiento de pezones en las crías macho al día 13 (media) | | | | | |
| **CRÍAS ANÓMALAS** | | | | | |
| Madres con 0 | | | | | |
| Madres con 1 | | | | | |
| Madres con ≥ 2 | | | | | |
| **PÉRDIDA DE DESCENDENCIA** | | | | | |
| **Prenatal (implantes menos nacimientos vivos)** | | | | | |
| Hembras con 0 | | | | | |
| Hembras con 1 | | | | | |
| Hembras con 2 | | | | | |
| Hembras con ≥ 3 | | | | | |
| **Posnatal (nacidos vivos menos vivos el día 13 posnatal)** | | | | | |
| Hembras con 0 | | | | | |
| Hembras con 1 | | | | | |
| Hembras con 2 | | | | | |
| Hembras con ≥ 3 | | | | | |

([1]) Último día del período de apareamiento.

▼M8

## B.65. MÉTODO DE ENSAYO *IN VITRO* CON BARRERA DE MEMBRANA PARA EVALUAR LA CORROSIÓN CUTÁNEA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 435 de la OCDE (2015). La corrosión cutánea se refiere a la producción de una lesión irreversible en la piel, que se manifiesta como necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, como consecuencia de la aplicación de un producto problema según la definición del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y del Reglamento (CE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea ([1]). El presente método de ensayo, que es equivalente a las directrices de ensayo TG 435 actualizadas de la OCDE, proporciona un método de ensayo con barrera de membrana *in vitro* que puede utilizarse para identificar los productos corrosivos. El método de ensayo utiliza una membrana artificial diseñada para responder a productos corrosivos de forma similar a la piel animal *in situ*.

2. Tradicionalmente, la corrosividad cutánea se ha evaluado aplicando el producto problema a la piel de animales vivos y evaluando el alcance de los daños tisulares tras un período de tiempo determinado (2). Además del presente método de ensayo, se han adoptado otros métodos de ensayo *in vitro* como alternativas (3) (4) al procedimiento normal de piel de conejo *in vivo* (capítulo B.4 del presente anexo, equivalente a las TG 404 de la OCDE) utilizado para identificar productos corrosivos (2). La estrategia escalonada de ensayo y valoración del SGA de las Naciones Unidas para la evaluación y clasificación de la corrosividad cutánea y el documento de orientación sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*) en relación con la irritación y la corrosión cutáneas recomiendan utilizar métodos de ensayo *in vitro* validados y aceptados con arreglo a los módulos 3 y 4 (1) (5). Los IATA describen varios módulos que agrupan las fuentes de información y herramientas de análisis, y i) aportan orientaciones sobre cómo integrar y utilizar los datos disponibles, tanto de ensayo como no experimentales, para la evaluación de la capacidad de irritación cutánea y de corrosión cutánea de los productos químicos, y ii) proponen un enfoque cuando se precisan más ensayos, incluido el caso de que se encuentren resultados negativos (5). En este enfoque modular, los resultados positivos de métodos de ensayo *in vitro* pueden utilizarse para clasificar un producto como corrosivo sin necesidad de realizar ensayos con animales, reduciendo así y afinando el uso de animales y evitando el dolor y la angustia que podrían producirse si se utilizaran animales para este fin.

3. Se han realizado estudios de validación para el modelo de barrera de membrana *in vitro*, comercializado como Corrositex® (6) (7) (8), que muestra una exactitud general para predecir la corrosividad cutánea del 79 % (128/163), una sensibilidad del 85 % (76/89), y una especificidad del 70 % (52/74) con una base de datos de 163 sustancias y mezclas (7). Sobre la base de su validez reconocida, se ha recomendado la utilización de este método de referencia validado (MRV) como parte de una estrategia escalonada de ensayos para evaluar el peligro potencial de corrosión cutánea de los productos (5) (7). Antes de que pueda utilizarse con fines normativos un modelo de barrera de membrana *in vitro* de evaluación de la corrosión cutánea, deben determinarse su fiabilidad, pertinencia (exactitud) y limitaciones para el uso propuesto, a fin de garantizar su similitud con el MRV (9), de acuerdo con las normas de comportamiento predefinidas (10). La aceptación mutua de datos por la OCDE solo se garantizará después de que se hayan revisado e

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M8

incluido en las directrices de ensayo equivalentes de la OCDE los eventuales métodos nuevos o actualizados propuestos que sigan las normas de comportamiento. En la actualidad, solo uno de los métodos *in vitro* está cubierto por las directrices de ensayo 435 de la OCDE y el presente método de ensayo, el modelo comercializado Corrositex®.

4. Otros métodos de ensayo para la evaluación de la corrosividad cutánea se basan en la utilización de piel humana reconstituida (TG 431 de la OCDE) (3) y de piel de rata aislada (TG 430 de la OCDE) (4). Las presentes directrices de ensayo contemplan también la subcategorización de los productos corrosivos en las tres subcategorías de corrosividad del SGA de las Naciones Unidas y los tres grupos de embalaje para el transporte de las Naciones Unidas en cuanto al peligro de corrosividad. Las directrices de ensayo se adoptaron originalmente en 2006 y se actualizaron en 2015 para referirse al documento de orientación sobre los IATA y actualizar la lista de sustancias para la prueba de la competencia.

DEFINICIONES

5. En el apéndice se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

6. El ensayo descrito en este método de ensayo permite la identificación de productos problema corrosivos y permite la subcategorización de los productos problema corrosivos según el SGA de las Naciones Unidas y del CLP (cuadro 1). Además, un método de ensayo de este tipo puede utilizarse para tomar decisiones sobre la corrosividad y la no corrosividad de determinadas clases de productos como, por ejemplo, ácidos orgánicos e inorgánicos, derivados de ácidos ([1]) y bases, a efectos de determinados ensayos relacionados con el transporte (7) (11) (12). Elpresente método de ensayo describe un procedimiento genérico similar al método de ensayo de referencia validado (7). Aunque el presente método no proporciona información adecuada sobre la irritación cutánea, cabe señalar que el método de ensayo B.46 (equivalente a las directrices de ensayo TG 439 de la OCDE) aborda específicamente el aspecto de la irritación cutánea *in vitro* (13). Para una evaluación completa de los efectos cutáneos locales tras una exposición cutánea única, debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los enfoques integrados de ensayos y evaluación (5).

*Cuadro 1*

**Categorías y subcategorías de corrosión cutánea del SGA de las Naciones Unidas** ([1])

| Categoría de corrosivo (categoría 1) (en el caso de las autoridades que no utilizan subcategorías) | Posibles subcategorías de corrosivo ([1]) (en el caso de las autoridades que utilizan subcategorías, incluido el Reglamento CLP) | Corrosivo en ≥ 1 de 3 animales | |
|---|---|---|---|
| | | Tiempo de exposición | Observación |
| Corrosivo | Corrosivo de subcategoría 1A | ≤ 3 minutos | ≤ 1 hora |
| | Corrosivo de subcategoría 1B | > 3 minutos / ≤ 1 hora | ≤ 14 días |
| | Corrosivo de subcategoría 1C | > 1 hora / ≤ 4 horas | ≤ 14 días |

([1]) En el caso de la UE, el Reglamento CLP aplica las tres subcategorías de corrosión cutánea 1A, 1B y 1C.

7. Una limitación del método de referencia validado (7) es que muchos productos no corrosivos y algunos productos corrosivos no pueden someterse a ensayo, sobre la base de los resultados del ensayo de compatibilidad inicial (véase el punto 13). Los productos acuosos con un pH comprendido entre

([1]) «Derivados de ácidos» es una denominación de clase inespecífica y se define en términos generales como un producto obtenido a partir de un ácido, bien directamente, bien por modificación o bien mediante sustitución parcial. Esta clase comprende los anhídridos, los ácidos halogenados, las sales y otros tipos de productos.

▼M8

4,5 y 8,5 a menudo no cumplen las condiciones para someterse a ensayo; sin embargo, el 85 % de los productos sometidos a ensayo en este intervalo de pH no eran corrosivos, en los ensayos con animales (7). El método con barrera de membrana *in vitro* puede utilizarse para el ensayo de sólidos (solubles o insolubles en agua), líquidos (acuosos o no acuosos) y emulsiones. Sin embargo, los productos problema que no provocan un cambio detectable en el ensayo de compatibilidad (es decir, cambio de color en el sistema de detección del producto que tiene el método de ensayo de referencia validado) no pueden someterse a ensayo utilizando el método con barrera de membrana y deben ensayarse utilizando otros métodos de ensayo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. El sistema de ensayo consta de dos componentes: una biobarrera macromolecular sintética y un sistema de detección del producto (CDS); este método de ensayo detecta, a través del CDS, el daño causado en la barrera de membrana por los productos problema corrosivos tras la aplicación del producto problema en la superficie de la barrera de membrana macromolecular sintética (7), presumiblemente por el mismo mecanismo o mecanismos de corrosión que funcionan en la piel viva.

9. La penetración a través de la barrera de membrana (o perforación) podría medirse por varios procedimientos o CDS, incluido un cambio en el color de un colorante indicador de pH o en alguna otra propiedad de la solución indicadora situada por debajo de la barrera.

10. Debe confirmarse que la barrera de membrana es válida, es decir, que es pertinente y fiable para el uso previsto. Esto incluye garantizar que diferentes preparados son constantes con respecto a las propiedades de la barrera como, por ejemplo, que son capaces de mantener una barrera frente a los productos no corrosivos, para poder clasificar las propiedades corrosivas de los productos en las diversas subcategorías de corrosividad del SGA de las Naciones Unidas (1). La clasificación asignada se basa en el tiempo que tarda un producto en penetrar a través de la barrera de membrana hasta llegar a la solución indicadora.

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

11. Antes de proceder al uso sistemático del método con barrera de membrana *in vitro*, según el presente método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta clasificación de las doce sustancias para la prueba de la competencia recomendadas en el cuadro 2. Cuando una sustancia de la lista no esté disponible o en casos justificados, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* [por ejemplo, de la lista de productos de referencia (10)] siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los descritos en el cuadro 1.

*Cuadro 2*

**Sustancias para la prueba de la competencia** (1)

| Sustancia (2) | N.º CAS | Clase química | Subcategoría del SGA de las Naciones Unidas *in vivo* (3) | Subcategoría del SGA de las Naciones Unidas *in vitro* (3) |
|---|---|---|---|---|
| Trifluoruro de boro dihidratado | 13319-75-0 | Ácidos inorgánicos | 1A | 1A |
| Ácido nítrico | 7697-37-2 | Ácidos inorgánicos | 1A | 1A |
| Pentacloruro de fósforo | 10026-13-8 | Precursores de ácidos inorgánicos | 1A | 1A |
| Cloruro de valerilo | 638-29-9 | Cloruros de ácidos | 1B | 1B |

▼**M8**

| Sustancia ([2]) | N.º CAS | Clase química | Subcategoría del SGA de las Naciones Unidas *in vivo* ([3]) | Subcategoría del SGA de las Naciones Unidas *in vitro* ([3]) |
|---|---|---|---|---|
| Hidróxido de sodio | 1310-73-2 | Bases inorgánicas | 1B | 1B |
| 1-(2-Aminoetil)piperazina | 140-31-8 | Aminas alifáticas | 1B | 1B |
| Cloruro de bencenosulfonilo | 98-09-9 | Cloruros de ácidos | 1C | 1C |
| N,N-Dimetilbencilamina | 103-83-3 | Anilinas | 1C | 1C |
| Tetraetilen-pentaamina | 112-57-2 | Aminas alifáticas | 1C | 1C |
| Eugenol | 97-53-0 | Fenoles | NC | NC |
| Acrilato de nonilo | 2664-55-3 | Acrilatos/metacrilatos | NC | NC |
| Bicarbonato de sodio | 144-55-8 | Sales inorgánicas | NC | NC |

([1]) Entre las doce sustancias enumeradas más arriba se incluyen tres sustancias de cada una de las tres subcategorías del SGA de las Naciones Unidas de sustancias corrosivas y tres sustancias no corrosivas, están disponibles fácilmente en los proveedores comerciales, y la subcategoría del SGA de las Naciones Unidas se basa en los resultados de ensayos *in vivo* de alta calidad. Estas sustancias proceden de la lista de 40 sustancias de referencia incluidas en la lista mínima de productos identificados para demostrar la exactitud y fiabilidad de los métodos de ensayo que son estructural y funcionalmente similares al método de ensayo de referencia validado, y han sido seleccionadas de entre los 163 productos de referencia que se utilizaron originalmente para validar el método de ensayo de referencia (Corrositex®) (7) (10) (14). El objetivo de este proceso de selección era incluir, en la medida de lo posible, productos que: son representativos de la gama de respuestas de corrosividad (p. ej., productos no corrosivos; corrosivos de los grupos de embalaje I, II y III de las Naciones Unidas) que el método de referencia validado es capaz de medir o predecir; son representativos de las clases químicas utilizadas en los estudios de validación; tienen estructuras químicas bien definidas; inducen resultados reproducibles con el método de ensayo de referencia validado; inducen resultados definitivos en el ensayo de referencia *in vivo*; se encuentran disponibles en el comercio; y no tienen asociados costes de eliminación prohibitivos (14).

([2]) Sustancias de las que se ha comprobado que no están mezcladas o que tienen una pureza ≥ 90 %

([3]) Los grupos de embalaje de las Naciones Unidas correspondientes son I, II y III, respectivamente, respecto a las categorías 1A, 1B y 1C del SGA de las Naciones Unidas y el CLP. NC: No corrosivo.

PROCEDIMIENTO

12. En los puntos siguientes se describen los componentes y procedimientos de un método de ensayo con barrera de membrana artificial para la evaluación de la corrosividad (7) (15), basado en el MRV actual, es decir, el método Corrositex® disponible en el comercio. La barrera de membrana y la solución indicadora / de compatibilidad, así como la de categorización, pueden construirse, prepararse u obtenerse en el comercio, como sucede con el MRV, Corrositex®. Se dispone de un protocolo de método de ensayo de muestras para el método de ensayo de referencia validado (7). Los ensayos deben realizarse a temperatura ambiente (17-25 °C) y los componentes deben cumplir las siguientes condiciones.

**Ensayo de compatibilidad con el producto problema**

13. Antes de realizar el ensayo con barrera de membrana, se realiza un ensayo de compatibilidad para determinar si el producto problema es detectable por el CDS. Si el CDS no detecta el producto problema, el método de ensayo con barrera de membrana no es adecuado para evaluar la posible corrosividad del producto problema y debe utilizarse otro método de ensayo diferente. El CDS y las condiciones de exposición utilizadas en el ensayo de compatibilidad deben reflejar la exposición en el subsiguiente ensayo con barrera de membrana.

**Ensayo de categoría del producto problema según la escala temporal**

14. Si es apropiado para el método de ensayo, el producto problema que haya pasado con éxito el ensayo de compatibilidad debe someterse a un ensayo de categoría según la escala temporal, es decir, a una prueba de cribado para distinguir entre ácidos o bases débiles y fuertes. Por ejemplo, en el método de ensayo de referencia validado se utiliza un ensayo de categorización según la escala temporal para indicar cuál de las dos escalas temporales

▼M8

debe utilizarse basándose en si se detecta una reserva ácida o alcalina significativa. Deben utilizarse dos escalas temporales diferentes de la perforación para determinar la corrosividad y la subcategoría de corrosividad cutánea del SGA de las Naciones Unidas, sobre la base de la reserva ácida o alcalina del producto problema.

COMPONENTES DEL MÉTODO DE ENSAYO CON BARRERA DE MEMBRANA

**Barrera de membrana**

15. La barrera de membrana consta de dos componentes: un gel acuoso macromolecular proteínico y una membrana permeable de soporte. El gel proteínico debe ser impermeable a los líquidos y sólidos, pero puede corroerse y hacerse permeable. La barrera de membrana totalmente construida debe conservarse en condiciones predeterminadas de las que se haya confirmado que impiden el deterioro del gel por fenómenos como, por ejemplo, secado, crecimiento microbiano, deslizamiento o cuarteado, que podrían afectar a su comportamiento. Debe determinarse el período de conservación aceptable, tras el que no se podrán utilizar los preparados de barrera de membrana.

16. La membrana permeable de soporte proporciona apoyo mecánico al gel proteínico durante el proceso de gelificación y la exposición al producto problema. La membrana de soporte debe evitar que el gel se ablande o se deslice, y ha de ser fácilmente permeable a todos los productos problema.

17. El gel proteínico, compuesto de proteínas como, por ejemplo, queratina, colágeno o mezclas de proteínas, que forman una matriz de gel, sirve como diana del producto problema. El material proteínico se coloca en la superficie de la membrana de soporte y se deja que gelifique antes de colocar la barrera de membrana encima de la solución indicadora. El gel proteínico debe tener por todos sitios el mismo espesor y la misma densidad, sin burbujas de aire ni defectos que puedan afectar a su integridad funcional.

**Sistema de detección del producto (CDS)**

18. La solución indicadora, que es la misma solución utilizada en el ensayo de compatibilidad, debe responder a la presencia de una producto problema. Debe utilizarse un colorante (o una combinación de colorantes) indicador de pH como, por ejemplo, rojo del cresol y naranja de metilo, que muestre un cambio de color en respuesta a la presencia del producto problema. El sistema de medición puede ser visual o electrónico.

19. Los sistemas de detección que se hayan elaborado para detectar el paso del producto problema a través de la membrana de barrera deben evaluarse en cuanto a su pertinencia y fiabilidad, a fin de demostrar la gama de productos que pueden detectarse y los límites cuantitativos de su detección.

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

**Conjunto de los componentes del método de ensayo**

20. La barrera de membrana se coloca en un frasco (o en un tubo) que contenga la solución indicadora, de forma que la membrana de soporte esté en pleno contacto con la solución indicadora y no haya presencia de burbujas de aire. Debe velarse por que se mantenga la integridad de la barrera.

▼M8

**Aplicación del producto problema**

21. Una cantidad adecuada del producto problema, por ejemplo 500 µl de un líquido o 500 mg de un sólido en polvo fino (7) se pone con cuidado en una capa por encima de la superficie superior de la barrera de membrana y se distribuye uniformemente. Se prepara un número adecuado de réplicas, por ejemplo cuatro (7), para cada producto problema y los testigos correspondientes (véanse los puntos 23 a 25). Se registra el momento de aplicación del producto problema a la barrera de membrana. Para garantizar que los tiempos de corrosión cortos se registran exactamente, se escalonan los tiempos de aplicación del producto problema a los frascos replicados.

**Medición de la penetración en las barreras de las membranas**

22. Cada frasco se controla adecuadamente, y se registra el tiempo del primer cambio de la solución indicadora, es decir, la penetración a través de la barrera, y se determina el tiempo transcurrido entre la aplicación y la penetración a través de la barrera de membrana.

**Testigos**

23. En los ensayos que impliquen el uso de un vehículo o disolvente con el producto problema, el vehículo o disolvente debe ser compatible con el sistema de barrera de membrana, es decir, no alterar la integridad del sistema de barrera de membrana, y no alterar la corrosividad del producto problema. Si procede, el control del disolvente (o del vehículo) debe someterse a ensayo en paralelo con el producto problema para demostrar la compatibilidad del disolvente con el sistema de barrera de membrana.

24. Un testigo positivo (corrosivo) con una actividad de corrosividad intermedia, por ejemplo 110 ± 15 mg de hidróxido de sodio (corrosivo de la categoría 1B del SGA de las Naciones Unidas) (7), debe someterse a ensayo en paralelo con el producto problema para evaluar si el sistema de ensayo se comporta de manera aceptable. Un segundo testigo positivo que sea de la misma clase química que el producto problema puede resultar útil para evaluar el potencial relativo de corrosividad de un producto problema corrosivo. Deben seleccionarse uno o más testigos positivos que sean intermedios en su corrosividad (por ejemplo, de la subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas) a fin de detectar eventuales cambios en el tiempo de penetración que puedan ser inaceptablemente superiores o inferiores al valor de referencia establecido, lo que indicaría que el sistema de ensayo no funciona correctamente. Con este fin, son de utilidad limitada los productos extremadamente corrosivos (de la subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas) o no corrosivos. Un producto corrosivo de la subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas permitiría detectar un tiempo de perforación demasiado corto o demasiado largo. Un producto ligeramente corrosivo (de la subcategoría 1C del SGA de las Naciones Unidas) podría utilizarse como testigo positivo a fin de medir la capacidad del método de ensayo para distinguir sistemáticamente entre productos débilmente corrosivos y no corrosivos. Independientemente del enfoque utilizado, debe elaborarse un intervalo de respuesta aceptable de los testigos positivos sobre la base del intervalo histórico de los tiempos de perforación de los testigos positivos empleados, como la media ± 2-3 desviaciones típicas. En cada estudio debe determinarse el tiempo exacto de perforación correspondiente al testigo positivo, de forma que puedan detectarse las desviaciones fuera del intervalo aceptable.

25. También debe someterse a ensayo en paralelo con el producto problema un testigo negativo (no corrosivo) como, por ejemplo, ácido cítrico al 10 % o ácido propiónico al 6 % (7), como otra medida de control de la calidad para demostrar la integridad funcional de la barrera de membrana.

▼M8

**Criterios de aceptabilidad del estudio**

26. Según los parámetros temporales establecidos para cada una de las subcategorías de corrosividad del SGA de las Naciones Unidas, el tiempo (en minutos) transcurrido entre la aplicación de un producto problema a la barrera de membrana y la penetración a través de la barrera se utiliza para predecir la corrosividad del producto problema. Para que un estudio se considere aceptable, el testigo positivo en paralelo debe dar el tiempo previsto de respuesta a la penetración (por ejemplo, un tiempo de perforación de 8-16 minutos si se utiliza el hidróxido sódico como testigo positivo), el testigo negativo en paralelo no debe ser corrosivo y, cuando se incluye, el control del disolvente en paralelo no debe ser corrosivo ni alterar el potencial de corrosividad del producto problema. Antes de proceder al uso sistemático de un método que se ajuste al presente método de ensayo, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las doce sustancias recomendadas en el cuadro 2. En el caso de los nuevos métodos «de imitación» elaborados en el marco del presente método de ensayo que son estructural y funcionalmente similares al método de referencia validado (14), deben utilizarse las normas de comportamiento predefinidas para demostrar la fiabilidad y exactitud del nuevo método antes de su uso en pruebas normativas (10).

**Interpretación de los resultados y clasificación de la corrosividad de los productos problema**

27. El tiempo (en minutos) transcurrido entre la aplicación del producto problema a la barrera de membrana y la penetración a través de esta se utiliza para clasificar el producto problema en términos de subcategorías de corrosión del SGA de las Naciones Unidas (1) y, si procede, de grupos de embalaje de las Naciones Unidas (16). Se establecen para cada método de ensayo propuesto unos valores umbral de tiempo correspondientes a cada una de las tres subcategorías de corrosión. Las decisiones finales sobre los tiempos umbral deben considerar la necesidad de minimizar la subclasificación del peligro corrosivo (es decir, los falsos negativos). En las presentes directrices de ensayo, deben utilizarse los tiempos umbral de Corrositex®, descritos en el cuadro 3, ya que representa el único método de ensayo que actualmente se ajusta a las directrices de ensayo (7).

*Cuadro 3*

**Modelo de predicción de Corrositex®**

| Tiempo medio de perforación (min.) | | Predicción del SGA de las Naciones Unidas ([3]) |
|---|---|---|
| Productos problema de categoría 1 ([1]) (determinados por el ensayo de categorización del método) | Productos problema de categoría 2 ([2]) (determinados por el ensayo de categorización del método) | |
| 0-3 min. | 0-3 min. | Corrosivo Subcategoría optativa 1A |
| > 3 a 60 min. | > 3 a 30 min. | Corrosivo Subcategoría optativa 1B |
| > 60 a 240 min. | > 30 a 60 min. | Corrosivo Subcategoría optativa 1C |
| > 240 min. | > 60 min. | No corrosivo |

([1]) Productos problema con alta reserva ácida/alcalina (6)
([2]) Productos problema con baja reserva ácida/alcalina (6)
([3]) Las subcategorías 1A, 1B y 1C del SGA de las Naciones Unidas corresponden respectivamente a los grupos de embalaje I, II y III de las Naciones Unidas.

▼**M8**

DATOS E INFORME

**Datos**

28. El tiempo (en minutos) transcurrido entre la aplicación y la penetración a través de la barrera del producto problema y del testigo o testigos positivos debe comunicarse en forma de cuadro con los datos de las distintas réplicas, así como la media ± la desviación típica de cada ensayo.

**Informe del ensayo**

29. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema y sustancias testigo:*

— Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.;

— Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— Origen; número de lote, si está disponible;

— Tratamiento del producto problema / sustancia testigo antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Estabilidad del producto problema, fecha límite de utilización, o fecha de nuevo análisis, si se conoce;

— Condiciones de conservación.

*Vehículo:*

— Identificación, concentración (en su caso), volumen utilizado;

— Motivación de la elección del vehículo.

*Modelo de barrera de membrana* in vitro *y protocolo utilizados, incluidas la exactitud y la fiabilidad demostradas*

*Condiciones de ensayo:*

— Descripción del equipo y de los procedimientos de preparación utilizados;

— Origen y composición de la barrera de membrana *in vitro* utilizada;

— Composición y propiedades de la solución indicadora;

— Método de detección;

— Cantidades de producto problema y de sustancias testigo;

— Número de réplicas;

— Descripción y justificación del ensayo de categorización de la escala temporal;

▼M8

— Método de aplicación;

— Tiempos de observación;

— Descripción de los criterios de evaluación y clasificación aplicados;

— Demostración de la competencia para la aplicación del método de ensayo antes de su uso sistemático mediante ensayo de las sustancias para la prueba de la competencia.

*Resultados:*

— Cuadro de datos brutos individuales de las distintas muestras de producto problema y de testigo respecto a cada réplica;

— Descripción de otros efectos observados;

— Clasificación derivada con referencia al modelo de predicción o a los criterios de decisión utilizados.

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA), quinta edición revisada, Naciones Unidas, Nueva York y Ginebra, 2013. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html

(2) Capítulo B.4 del presente anexo, Toxicidad aguda: irritación/corrosión cutánea.

(3) Capítulo B.40 *bis* del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: método de ensayo con epidermis humana reconstruida (EHR).

(4) Capítulo B.40 del presente anexo, Corrosión cutánea *in vitro*: Resistencia eléctrica transcutánea (RET).

(5) OCDE (2015): Guidance Document on Integrated Approaches to Testing and Assessment of Skin Irritation/Corrosion. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No 203). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.-G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM International Validation Study on *In Vitro* Tests for Skin Corrosivity. 2. Results and Evaluation by the Management Team. Toxicology *In Vitro* 12, 483-524.

(7) ICCVAM (1999). Corrositex®. An *In Vitro* Test Method for Assessing Dermal Corrosivity Potential of Chemicals. The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by ICCVAM, NTP and NICEATM. NIEHS, NIH Publication (No 99-4495.)

(8) Gordon V.C., Harvell J.D. and Maibach H.I. (1994). Dermal Corrosion, the Corrositex® System: A DOT Accepted Method to Predict Corrosivity Potential of Test Materials. *In vitro* Skin Toxicology-Irritation, Phototoxicity, Sensitization. Alternative Methods in Toxicology 10, 37-45.

▼**M8**

(9) OCDE (2005): Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications. Series on testing and Assessment (No 34).

(10) OCDE (2014). Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion in Relation to TG 435. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/PerfStand-TG430-June14.pdf.

(11) ECVAM (2001). Statement on the Application of the CORROSITEX® Assay for Skin Corrosivity Testing. 15th Meeting of ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC), Ispra, Italy. ATLA 29, 96-97.

(12) U.S. DOT (2002). Exemption DOT-E-10904 (Fifth Revision). (September 20, 2002). Washington, D.C., U.S. DOT.

(13) Capítulo B.46 del presente anexo, Irritación cutánea *in vitro*: Método de ensayo con epidermis humana reconstruida. ICCVAM (2004). ICCVAM Recommended Performance Standards for *In Vitro* Test Methods for Skin Corrosion. NIEHS, NIH Publication No 04-4510. Disponible en: http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/dermal_docs/ps/ps044510.pdf.

(14) U.S. EPA (1996). Method 1120, Dermal Corrosion. Disponible en: http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/1120.pdf.

(15) Naciones Unidas (2013). Recomendaciones de las Naciones Unidas relativas al transporte de mercancías peligrosas, Reglamentación modelo, 18.ª edición revisada (parte, capítulo 2.8), Naciones Unidas, 2013. Disponible en: https://shop.un.org/es/series/recomendaciones-relativas-al-transporte-de-mercanc-peligrosas-reglamentaci-n-modelo.

▼**M8**

*Apéndice*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (9).

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Sistema de detección del producto (CDS)**: Sistema de medición visual o electrónico con una solución indicadora que responde a la presencia de un producto problema, por ejemplo mediante un cambio en un colorante (o una combinación de colorantes) indicador de pH que muestre un cambio de color en respuesta a la presencia del producto problema o mediante otros tipos de reacciones químicas o electroquímicas.

**Concordancia**: Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo que da un resultado categorial, y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «exactitud» se pueden usar indistintamente, y se define como la proporción de todos los productos estudiados que se clasifican correctamente como positivos o negativos. La concordancia depende en gran medida de la prevalencia de positivos en los tipos de producto problema que se están examinando (9).

**SGA (Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos)**: Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

**IATA**: Enfoque integrado de pruebas y evaluación (*Integrated Approach to Testing and Assessment*).

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

**Sustancia de un solo componente:**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**Sustancia de componentes múltiples**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración $\geq$ 10 % (p/p) y $<$ 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

**NC**: No corrosivo.

**Normas de comportamiento**: Normas, basadas en un método de referencia validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen aquí: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (9).

▼**M8**

**Pertinencia**: Descripción de la relación del método de ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el método de ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (9).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios (9).

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

**Corrosión cutánea *in vivo***: Producción de una lesión irreversible de la piel; en particular, necrosis visible a través de la epidermis y que llega a la dermis, como consecuencia de la aplicación de un producto problema durante hasta cuatro horas. Las reacciones corrosivas se caracterizan por úlceras, sangrado, costras sanguinolentas y, hacia el final del período de observación de catorce días, por decoloración debida al blanqueo de la piel, zonas completas de alopecia y cicatrices. Debe considerarse la realización de un examen histopatológico para evaluar las lesiones dudosas.

**Especificidad**: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el método de ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (9).

**Sustancia**: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos.

▼M8

## B.66. ENSAYOS *IN VITRO* DE TRANSACTIVACIÓN TRANSFECTADA ESTABLEMENTE PARA DETECTAR AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DE LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS

INTRODUCCIÓN GENERAL

**Directrices de ensayo de la OCDE sobre la base del comportamiento**

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 455 de la OCDE (2016). Estas son unas directrices de ensayo basadas en el comportamiento (PBTG, *performance-based test guideline*), que describen la metodología de los ensayos *in vitro* de transactivación transfectada establemente para detectar agonistas y antagonistas de los receptores estrogénicos (ensayos ER TA, *Estrogen Receptor Transactivation Assays*). Comprenden varios métodos de ensayo similares desde el punto de vista mecánico y funcional para la identificación de los agonistas y antagonistas de los receptores estrogénicos (es decir, ERα, y/o ERβ) y deben facilitar la elaboración de nuevos métodos de ensayo similares o modificados, de conformidad con los principios de validación expuestos en el documento de orientación de la OCDE sobre la validación y la aceptación internacional de métodos de ensayo nuevos o actualizados para la evaluación de peligros (*Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*) (1). Los métodos de ensayo de referencia plenamente validados (apéndice 2 y apéndice 3) que sirven de base a estas PBTG son los siguientes:

   — el ensayo de transactivación transfectada establemente (STTA, *Stably Transfected TA*) (2) con la línea celular (h) ERα-HeLa-9903; y

   — el ensayo VM7Luc ER TA (3) con la línea celular VM7Luc4E2 ([1]) que expresa predominantemente hERα con cierta contribución de hERβ (4) (5).

   Para la elaboración y la validación de ensayos similares relativos al mismo parámetro de peligro, se dispone de normas de comportamiento (6) (7), que deben utilizarse. Permiten la oportuna modificación de las PBTG 455, para que puedan añadirse a unas PBTG actualizadas nuevos ensayos similares; sin embargo, esos ensayos similares solo se añadirán después de que la OCDE haya examinado si se cumplen las normas de comportamiento y haya manifestado que es así. Los ensayos incluidos en las TG 455 pueden utilizarse indistintamente para satisfacer los requisitos de los países miembros de la OCDE en cuanto a los resultados de los ensayos sobre la transactivación de receptores estrogénicos, y también se benefician de la aceptación mutua de datos de la OCDE.

**Antecedentes y principios de los ensayos incluidos en este método de ensayo**

2. La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos de cribado y finales de posibles alteradores endocrinos. El marco conceptual

([1]) Hasta junio de 2016, esta línea celular se designaba BG1Luc. Las células BG-1 fueron descritas inicialmente por Geisinger *et al*. (1998) (35) y fueron caracterizadas más tarde por investigadores del National Institute of Environmental Health Sciences de EE. UU. (NIEHS) (36). Hace relativamente poco tiempo, se ha descubierto que existen dos variantes diferentes de las células BG-1 que utilizan los investigadores, la BG-1 Fr y la BG-1 NIEHS. Un análisis en profundidad, con ensayos de ADN, de las dos variantes de las líneas celulares BG-1 llevado a cabo por Li y colaboradores (2014) (37) puso de manifiesto que la BG-1 Fr era única y que la BG-1 NIEHS, es decir, la línea celular original utilizada para elaborar el ensayo, no era la línea celular BG1 de carcinoma de ovario humano, sino que era en cambio una variante de la línea celular MCF7 del cáncer de mama humano. La línea celular utilizada en el ensayo, anteriormente denominada BG1Luc4E2 (38), se designa ahora como VM7Luc4E2 («V» = variante; «M7» = células MCF7). Asimismo, el ensayo se designa ahora como VM7Luc ER TA. Aunque esto cambia el origen de la línea celular en la que se basa el ensayo, no afecta a los estudios de validación publicados ni a la utilidad y aplicación de este ensayo para detectar productos con efectos estrogénicos/antiestrogénicos.

▼M8

de la OCDE para los ensayos y la evaluación de posibles alteradores endocrinos se revisó en 2012. Los marcos conceptuales originales y revisados se incluyen como anexos en el documento de orientación de la OCDE sobre las directrices de ensayo normalizadas para la evaluación de los productos en cuanto a las alteraciones endocrinas (8). El marco conceptual se compone de cinco niveles, cada uno de los cuales corresponde a un nivel diferente de complejidad biológica. Los ensayos de transactivación de receptores estrogénicos (ER TA) descritos en este método de ensayo son de nivel 2, que incluye los ensayos *in vitro* que aportan datos sobre el mecanismo o mecanismos y rutas endocrinos seleccionados. Este método de ensayo se refiere a ensayos de transactivación (TA) *in vitro* diseñados para identificar a los agonistas y antagonistas de los receptores estrogénicos (ER).

3. La interacción de los estrógenos con los ER puede afectar a la transcripción de genes controlados por estrógenos, lo cual puede dar lugar a la inducción o a la inhibición de procesos celulares, incluidos los necesarios para la proliferación celular, el desarrollo fetal normal y la función reproductora (9) (10) (11). La perturbación de los sistemas estrogénicos normales puede provocar efectos adversos sobre el desarrollo normal (ontogénesis), la salud reproductiva y la integridad del aparato reproductor.

4. Los ensayos TA *in vitro* se basan en una interacción directa o indirecta de las sustancias con un receptor específico que regula la transcripción de un producto del gen marcador. Estos ensayos se han utilizado ampliamente para evaluar la expresión génica regulada por receptores nucleares específicos como, por ejemplo, los ER (12) (13) (14) (15) (16), y se han propuesto para la detección de la transactivación estrogénica regulada por los ER (17) (18) (19). Hay por lo menos dos subtipos importantes de ER nucleares, los α y los β, que están codificados por distintos genes. Las respectivas proteínas tienen funciones biológicas diferentes, así como diferentes distribuciones tisulares y afinidades para unirse a ligandos (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26). El ERα nuclear media la respuesta estrogénica clásica (27) (28) (29) (30), por lo que la mayoría de los modelos que se están elaborando actualmente para medir la activación o inhibición del ER son específicos de ERα. Los ensayos se utilizan para identificar los productos que activan (o inhiben) el ER tras la unión al ligando, después de lo cual el complejo receptor-ligando se une a unos elementos específicos de respuesta de ADN y transactiva un gen marcador, lo que da lugar a mayor expresión celular de una proteína marcadora. En estos ensayos pueden utilizarse diferentes respuestasde marcadores. En los sistemas basados en la luciferasa, esta enzima transforma el sustrato de luciferina en un producto bioluminiscente que puede medirse cuantitativamente con un luminómetro. Otros ejemplos de marcadores comunes son el gen de la proteína fluorescente y el gen *LacZ*, que codifica la β-galactosidasa, enzima que puede transformar el sustrato incoloro X-gal (5-bromo-4-cloro-indolil-galactopiranósido) en un producto de color azul que puede cuantificarse con un espectrofotómetro. Estos marcadores pueden evaluarse de forma rápida y poco costosa con los equipos de pruebas disponibles en el comercio.

5. Los estudios de validación de los ensayos STTA y VM7Luc TA han demostrado su pertinencia y fiabilidad con respecto a su finalidad prevista (3) (4) (5) (30). Las normas de comportamiento de los ensayos ER TA basados en la luminiscencia que utilizan líneas celulares de cáncer de mama se incluyen en el informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM relativo al método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): ensayo *in vitro* para identificar la actividad agonista y antagonista de los receptores estrogénicos humanos de los productos (3). Estas normas de comportamiento se han modificado para que sean aplicables tanto a los ensayos STTA como a los VM7Luc TA (2).

6. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

▼M8

**Ámbito de aplicación y limitaciones relativas a los ensayos TA**

7. Estos ensayos se proponen para fines de cribado y establecimiento de prioridades, pero también pueden proporcionar información mecánica que pueda utilizarse con un enfoque de ponderación de los ensayos. Se refieren a la TA inducida por un producto que se une a los ER en un sistema *in vitro*. Así pues, los resultados no deben extrapolarse directamente a la compleja señalización y regulación del sistema endocrino intacto *in vivo*.

8. La TA mediada por los ER se considera uno de los mecanismos clave de la alteración endocrina (AE), aunque existen otros mecanismos a través de los cuales se puede producir esta, entre ellos: i) interacciones con otros receptores y sistemas enzimáticos dentro del sistema endocrino, ii) síntesis de hormonas, iii) activación y/o inactivación metabólica de hormonas, iv) distribución de hormonas a los tejidos diana, y v) eliminación de hormonas del organismo. Ninguno de los ensayos con arreglo al presente método de ensayo aborda estos modos de acción.

9. El presente método de ensayo aborda la capacidad de los productos para activar (es decir, actuar como agonistas) y también suprimir (es decir, actuar como antagonistas) la transcripción dependiente de los ER. Algunos productos pueden, en función del tipo de células, mostrar actividad tanto agonista como antagonista y se conocen como moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM). Los productos que son negativos en estos ensayos pueden evaluarse en un ensayo de unión a ER antes de llegar a la conclusión de que el producto no se une al receptor. Además, solo es probable que los ensayos informen sobre la actividad de la molécula madre teniendo en cuenta la limitada capacidad de metabolización de los sistemas celulares *in vitro*. Teniendo en cuenta que durante la validación únicamente se utilizaron sustancias solas, no se ha abordado la aplicabilidad a mezclas problema. Sin embargo, el método de ensayo es teóricamente aplicable a los ensayos de sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas. Antes de la utilización del método de ensayo con una sustancia de componentes múltiples, UVCB o mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

10. A efectos de información, en el cuadro 1 se presentan los resultados de los ensayos de actividad agonista correspondientes a las 34 sustancias que se sometieron a ensayo con los dos métodos de ensayo de referencia plenamente validados descritos en el presente método de ensayo. De estas sustancias, 26 se clasifican como agonistas ER definitivos y 8 son negativas sobre la base de los informes publicados, incluidos los ensayos *in vitro* de unión a ER y de TA, y/o el ensayo uterotrófico (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34). En el cuadro 2 se presentan los resultados de los ensayos de actividad antagonista correspondientes a las 15 sustancias que se sometieron a ensayo con los dos métodos de ensayo de referencia plenamente validados descritos en el presente método de ensayo. De estas sustancias, 4 se clasifican como antagonistas ER definitivos/supuestos y 10 son negativas sobre la base de los informes publicados, incluidos los ensayos *in vitro* de unión a ER y de TA (2) (3) (18) (31). En referencia a los datos resumidos en los cuadros 1 y 2, había un 100 % de concordancia entre los dos métodos de ensayo de referencia en la clasificación de todas las sustancias, excepto una (mifepristona), en cuanto al ensayo de la actividad antagonista, y cada sustancia se clasificó correctamente como agonista/antagonista ER o negativa. En las normas de comportamiento aplicables a la ER TA (6) (7), apéndice 2 (cuadros 1, 2 y 3) se ofrece información suplementaria sobre este grupo de productos, así como sobre otros productos objeto de los ensayos de tipo STTA y VM7Luc ER durante los estudios de validación.

▼M8

*Cuadro 1*

**Resumen de los resultados de los ensayos STTA y VM7Luc ER AT con sustancias objeto de los dos ensayos de la actividad agonista y clasificadas como agonistas ER (POS) o negativas (NEG)**

| | Sustancia | N.º CAS | Ensayo STTA [1] | | | Ensayo VM7Luc ER TA [2] | | Procedencia de los datos para la clasificación [4] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Actividad ER TA | Valor $CP_{10}$ (M) | Valor $CP_{50}$ [b] (M) | Actividad ER TA | Valor $CE_{50}$ [b], [3] (M) | Otras ER TA [c] | Unión ER | Uterotrófico |
| 1 | 17ß-Estradiol [a] | 50-28-2 | POS | $< 1{,}00 \times 10^{-11}$ | $< 1{,}00 \times 10^{-11}$ | POS | $5{,}63 \times 10^{-12}$ | POS (227/227) | POS | POS |
| 2 | 17α-Estradiol [a] | 57-91-0 | POS | $7{,}24 \times 10^{-11}$ | $6{,}44 \times 10^{-10}$ | POS | $1{,}40 \times 10^{-9}$ | POS (11/11) | POS | POS |
| 3 | 17α-Etinil-estradiol [a] | 57-63-6 | POS | $< 1{,}00 \times 10^{-11}$ | $< 1{,}00 \times 10^{-11}$ | POS | $7{,}31 \times 10^{-12}$ | POS (22/22) | POS | POS |
| 4 | 17β-Trembolona | 10161-33-8 | POS | $1{,}78 \times 10^{-8}$ | $2{,}73 \times 10^{-7}$ | POS | $4{,}20 \times 10^{-8}$ | POS (2/2) | NE | NE |
| 5 | 19-Nortestosteron [a] | 434-22-0 | POS | $9{,}64 \times 10^{-9}$ | $2{,}71 \times 10^{-7}$ | POS | $1{,}80 \times 10^{-6}$ | POS (4/4) | POS | POS |
| 6 | 4-Cumilfenol [a] | 599-64-4 | POS | $1{,}49 \times 10^{-7}$ | $1{,}60 \times 10^{-6}$ | POS | $3{,}20 \times 10^{-7}$ | POS (5/5) | POS | NE |
| 7 | 4-*terc*-Octilfenol [a] | 140-66-9 | POS | $1{,}85 \times 10^{-9}$ | $7{,}37 \times 10^{-8}$ | POS | $3{,}19 \times 10^{-8}$ | POS (21/24) | POS | POS |
| 8 | Apigenin [a] | 520-36-5 | POS | $1{,}31 \times 10^{-7}$ | $5{,}71 \times 10^{-7}$ | POS | $1{,}60 \times 10^{-6}$ | POS (26/26) | POS | NE |
| 9 | Atrazin [a] | 1912-24-9 | NEG | — | — | NEG | — | NEG (30/30) | NEG | NE |
| 10 | Bisfenol A [a] | 80-05-7 | POS | $2{,}02 \times 10^{-8}$ | $2{,}94 \times 10^{-7}$ | POS | $5{,}33 \times 10^{-7}$ | POS (65/65) | POS | POS |
| 11 | Bisfenol B [a] | 77-40-7 | POS | $2{,}36 \times 10^{-8}$ | $2{,}11 \times 10^{-7}$ | POS | $1{,}95 \times 10^{-7}$ | POS (6/6) | POS | POS |
| 12 | Ftalato de butilbencilo [a] | 85-68-7 | POS | $1{,}14 \times 10^{-6}$ | $4{,}11 \times 10^{-6}$ | POS | $1{,}98 \times 10^{-6}$ | POS (12/14) | POS | NEG |

▼M8

| | Sustancia | N.º CAS | Ensayo STTA [1] | | | Ensayo VM7Luc ER TA [2] | | Procedencia de los datos para la clasificación [4] | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Actividad ER TA | Valor $CP_{10}$ (M) | Valor $CP_{50}$ [b] (M) | Actividad ER TA | Valor $CE_{50}$ [b], [3] (M) | Otras ER TA [c] | Unión ER | Uterotrófico |
| 13 | Corticosteron [a] | 50-22-6 | NEG | — | — | NEG | — | NEG (6/6) | NEG | NE |
| 14 | Cumestrol [a] | 479-13-0 | POS | $1{,}23 \times 10^{-9}$ | $2{,}00 \times 10^{-8}$ | POS | $1{,}32 \times 10^{-7}$ | POS (30/30) | POS | NE |
| 15 | Daidzeín [a] | 486-66-8 | POS | $1{,}76 \times 10^{-8}$ | $1{,}51 \times 10^{-7}$ | POS | $7{,}95 \times 10^{-7}$ | POS (39/39) | POS | POS |
| 16 | Dietilestilbestrol [a] | 56-53-1 | POS | $< 1{,}00 \times 10^{-11}$ | $2{,}04 \times 10^{-11}$ | POS | $3{,}34 \times 10^{-11}$ | POS (42/42) | POS | NE |
| 17 | Ftalato de di-n-butilo | 84-74-2 | POS | $4{,}09 \times 10^{-6}$ | | POS | $4{,}09 \times 10^{-6}$ | POS (6/11) | POS | NEG |
| 18 | Etilparabeno | 120-47-8 | POS | $5{,}00 \times 10^{-6}$ | (sin $CP_{50}$) | POS | $2{,}48 \times 10^{-5}$ | POS | | NE |
| 19 | Estron [a] | 53-16-7 | POS | $3{,}02 \times 10^{-11}$ | $5{,}88 \times 10^{-10}$ | POS | $2{,}34 \times 10^{-10}$ | POS (26/28) | POS | POS |
| 20 | Genisteín [a] | 446-72-0 | POS | $2{,}24 \times 10^{-9}$ | $2{,}45 \times 10^{-8}$ | POS | $2{,}71 \times 10^{-7}$ | POS (100/102) | POS | POS |
| 21 | Haloperidol | 52-86-8 | NEG | — | — | NEG | — | NEG (2/2) | NEG | NE |
| 22 | Canferol [a] | 520-18-3 | POS | $1{,}36 \times 10^{-7}$ | $1{,}21 \times 10^{-6}$ | POS | $3{,}99 \times 10^{-6}$ | POS (23/23) | POS | NE |
| 23 | Kepone [a] | 143-50-0 | POS | $7{,}11 \times 10^{-7}$ | $7{,}68 \times 10^{-6}$ | POS | $4{,}91 \times 10^{-7}$ | POS (14/18) | POS | NE |
| 24 | Ketoconazol | 65277-42-1 | NEG | — | — | NEG | — | NEG (2/2) | NEG | NE |
| 25 | Linurón [a] | 330-55-2 | NEG | — | — | NEG | — | NEG (8/8) | NEG | NE |
| *26* | *meso*-Hexestrol [a] | 84-16-2 | POS | $< 1{,}00 \times 10^{-11}$ | $2{,}75 \times 10^{-11}$ | POS | $1{,}65 \times 10^{-11}$ | POS (4/4) | POS | NE |
| 27 | Metil-testosteron [a] | 58-18-4 | POS | $1{,}73 \times 10^{-7}$ | $4{,}11 \times 10^{-6}$ | POS | $2{,}68 \times 10^{-6}$ | POS (5/6) | POS | NE |

▼M8

| | Sustancia | N.º CAS | Ensayo STTA ([1]) | | | Ensayo VM7Luc ER TA ([2]) | | Procedencia de los datos para la clasificación ([4]) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Actividad ER TA | Valor $CP_{10}$ (M) | Valor $CP_{50}$ ([b]) (M) | Actividad ER TA | Valor $CE_{50}$ ([b]), ([3]) (M) | Otras ER TA ([c]) | Unión ER | Uterotrófico |
| 28 | Morina | 480-16-0 | POS | $5{,}43 \times 10^{-7}$ | $4{,}16 \times 10^{-6}$ | POS | $2{,}37 \times 10^{-6}$ | POS (2/2) | POS | NE |
| 29 | Noretinodrel ([a]) | 68-23-5 | POS | $1{,}11 \times 10^{-11}$ | $1{,}50 \times 10^{-9}$ | POS | $9{,}39 \times 10^{-10}$ | POS (5/5) | POS | NE |
| 30 | *p,p'*-Metoxicloro ([a]) | 72-43-5 | POS | $1{,}23 \times 10^{-6}$ | (sin $CP_{50}$) ([a]) | POS | $1{,}92 \times 10^{-6}$ | POS (24/27) | POS | POS |
| 31 | Fenobarbital ([a]) | 57-30-7 | NEG | — | — | NEG | — | NEG (2/2) | NEG | NE |
| 32 | Reserpina | 50-55-5 | NEG | — | — | NEG | — | NEG (4/4) | NEG | NE |
| 33 | Espironolacton ([a]) | 52-01-7 | NEG | — | — | NEG | — | NEG (4/4) | NEG | NE |
| 34 | Testosterona | 58-22-0 | POS | $2{,}82 \times 10^{-8}$ | $9{,}78 \times 10^{-6}$ | POS | $1{,}75 \times 10^{-5}$ | POS (5/10) | POS | NE |

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; M = molar; $CE_{50}$ = concentración de la sustancia problema que produce la mitad del efecto máximo; NEG = negativo; POS = positivo; NE = No se ha ensayado; $CP_{10}$ (y $CP_{50}$) = concentración de una sustancia problema a la que la respuesta es del 10 % (o del 50 % en el caso de la $CP_{50}$) de la respuesta inducida por el testigo positivo (E2, 1 nm) en cada placa.

([a]) Sustancias comunes objeto de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA, que se calificaron como agonistas ER o negativos y se utilizaron para evaluar la exactitud en el estudio de validación VM7Luc ER TA [informe de evaluación VM7Luc ER TA del ICCVAM, cuadro 4-1 (3)].

([b]) La concentración máxima sometida a ensayo en ausencia de limitaciones por citotoxicidad o insolubilidad fue de $1 \times 10^{-5}$ M (ensayo STTA) y $1 \times 10^{-3}$ M (ensayo VM7Luc ER TA).

([c]) Los números entre paréntesis representan los resultados de los ensayos clasificados como positivos (POS) o negativos (NEG) sobre el número total de estudios de referencia.

([1]) Valores comunicados en el proyecto de informe de prevalidación y de validación interlaboratorios del ensayo de activación transcripcional (TA) transfectada establemente para detectar actividad estrogénica - ensayo de gen marcador mediado por el receptor estrogénico alfa humano utilizando la línea celular hER-HeLa-9903 (2).

([2]) Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): método *in vitro* para identificar agonistas y antagonistas ER (3).

([3]) Los valores medios de la $CE_{50}$ se calcularon con los valores comunicados por los laboratorios del estudio de validación VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, y Hiyoshi) (3).

([4]) La clasificación como agonista ER o negativo se basó en la información contenida en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM (BRD) sobre los métodos de ensayo de unión a los ER y TA (31), así como en la información obtenida de las publicaciones publicadas y revisadas tras la finalización de los BRD del ICCVAM (2) (3) (18) (31) (33) (34).

Notas: Cada ensayo dentro del presente método de ensayo no cuenta con las mismas mediciones. En algunas situaciones, no puede calcularse la $CE_{50}$ porque no se genera una curva completa dosís-respuesta. Aunque con el ensayo STTA el valor de $CP_{10}$ es una medición clave, también puede haber otros ejemplos en los que un valor de $CP_x$ proporcione información útil.

▼M8

*Cuadro 2*

**Resumen de los resultados de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA con sustancias objeto de los dos ensayos de la actividad antagonista y clasificadas como antagonistas ER (POS) o negativas (NEG)**

| | Sustancia (a) | N.º CAS | Ensayo ER STTA (1) | | Ensayo VM7Luc ER TA (2) | | Efectos candidatos del ER STTA (4) | Clasificación de consenso del IC-CVAM (5) Clase química | del MeSH (6) | Clase de producto (7) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Actividad ER TA | Valor de $CI_{50}$ (b) (M) | Actividad ER TA | Valor de $CI_{50}$ (b), (3) (M) | | | | |
| 1 | 4-Hidroxitamoxifeno | 68047-06-3 | POS | $3{,}97 \times 10^{-9}$ | POS | $2{,}08 \times 10^{-7}$ | POS moderado | POS | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos |
| 2 | Dibenzo[a,h]antraceno | 53-70-3 | POS | Sin $CI_{50}$ | POS | Sin $CI_{50}$ | POS | SP | Compuestos policíclicos | Productos de laboratorio, productos naturales |
| 3 | Mifepristona | 84371-65-3 | POS | $5{,}61 \times 10^{-6}$ | NEG | — | POS suave | NEG | Esteroides | Productos farmacéuticos |
| 4 | Raloxifeno HCl | 82640-04-8 | POS | $7{,}86 \times 10^{-10}$ | POS | $1{,}19 \times 10^{-9}$ | POS moderado | POS | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos |
| 5 | Tamoxifeno | 10540-29-1 | POS | $4{,}91 \times 10^{-7}$ | POS | $8{,}17 \times 10^{-7}$ | POS | POS | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos |
| 6 | 17β-Estradiol | 50-28-2 | NEG | — | NEG | — | SN | SN | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |

▼M8

| | Sustancia ([a]) | N.º CAS | Ensayo ER STTA ([1]) | | Ensayo VM7Luc ER TA ([2]) | | Efectos candidatos del ER STTA ([4]) | Clasificación de consenso del IC-CVAM ([5]) Clase química | del MeSH ([6]) | Clase de producto ([7]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Actividad ER TA | Valor de $CI_{50}$ ([b]) (M) | Actividad ER TA | Valor de $CI_{50}$ ([b]), ([3]) (M) | | | | |
| 7 | Apigenina | 520-36-5 | NEG | — | NEG | — | NEG | NEG | Compuestos heterocíclicos | Colorantes, productos naturales, productos intermedios farmacéuticos |
| 8 | Atrazina | 1912-24-9 | NEG | — | NEG | — | NEG | SN | Compuestos heterocíclicos | Herbicidas |
| 9 | Ftalato de di-n-butilo | 84-74-2 | NEG | — | NEG | — | NEG | NEG | Ésteres, ácido ftálico | Ingredientes de cosméticos, productos industriales, plastificantes |
| 10 | Fenarimol | 60168-88-9 | NEG | — | NEG | — | No se ha ensayado | SN | Compuestos heterocíclicos, pirimidina | Fungicidas |
| 11 | Flavona | 525-82-6 | NEG | — | NEG | — | SN | SN | Flavonoides, compuestos heterocíclicos | Productos naturales, productos farmacéuticos |
| 12 | Flutamida | 13311-84-7 | NEG | — | NEG | — | NEG | SN | Amidas | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 13 | Genisteína | 446-72-0 | NEG | — | NEG | — | SN | NEG | Flavonoides, compuestos heterocíclicos | Productos naturales, productos farmacéuticos |

▼M8

| | Sustancia ([a]) | N.º CAS | Ensayo ER STTA ([1]) | | Ensayo VM7Luc ER TA ([2]) | | Efectos candidatos del ER STTA ([4]) | Clasificación de consenso del ICCVAM ([5]) Clase química | del MeSH ([6]) | Clase de producto ([7]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Actividad ER TA | Valor de $CI_{50}$ ([b]) (M) | Actividad ER TA | Valor de $CI_{50}$ ([b]), ([3]) (M) | | | | |
| 14 | *p*-n-Nonilfenol | 104-40-5 | NEG | — | NEG | — | No se ha ensayado | NEG | Fenoles | Productos intermedios |
| 15 | Resveratrol | 501-36-0 | NEG | — | NEG | — | SN | NEG | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos naturales |

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; M = molar; $CI_{50}$ = concentración de la sustancia problema que produce la mitad de la inhibición máxima; NEG = negativo; SP = supuesto negativo; POS = positivo; SP = supuesto positivo.

([a]) Sustancias comunes objeto de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA, que se calificaron como antagonistas ER o negativos y se utilizaron para evaluar la exactitud en el informe de validación del VM7Luc ER TA (2) (3).

([b]) La concentración máxima sometida a ensayo en ausencia de limitaciones por citotoxicidad o insolubilidad fue de $1 \times 10^{-3}$ M (ensayo STTA) y $1 \times 10^{-5}$ M (ensayo VM7Luc ER TA).

([1]) Informe de validación del ensayo de activación transcripcional transfectada establemente para detectar actividad mediada por ER, parte B (2).

([2]) Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): método *in vitro* para identificar agonistas y antagonistas ER (3).

([3]) Los valores medios de la $CI_{50}$ se calcularon con los valores comunicados por los laboratorios del estudio de validación VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, y Hiyoshi) (3).

([4]) Actividad ER STTA asumida a partir de sus efectos notificados conocidos por los datos históricos del CERI sobre el ensayo de unión con el receptor ER, el ensayo uterotrófico y la información recopilada a partir de la bibliografía de acceso público (2).

([5]) La clasificación como antagonista ER o negativo se basó en la información contenida en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM (BRD) sobre los ensayos de unión a los ER y TA (31), así como en la información obtenida de las publicaciones publicadas y revisadas tras la finalización de los BRD del ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Las sustancias se asignaron a una o varias clases químicas con arreglo al U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), que es un sistema de clasificación normalizado internacionalmente reconocido (http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Las sustancias se asignaron a una o varias clases de producto con arreglo al banco de datos U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponible en http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA

**Componentes esenciales del ensayo**

11. Este método de ensayo se aplica a los ensayos que utilizan un receptor ERα transfectado establemente o endógeno y una construcción de gen marcador transfectado establemente bajo el control de uno o más elementos de respuesta estrogénica; sin embargo, pueden estar presentes otros receptores, como el ERβ. Estos son los componentes esenciales del ensayo.

**Testigos**

12. Debe describirse la base de los patrones de referencia en paralelo propuestos para cada ensayo de agonistas y de antagonistas. Los testigos en paralelo (negativos, de disolvente y positivos), según proceda, sirven para indicar que el ensayo funciona en las condiciones de ensayo y proporcionan la base para comparar unos experimentos con otros; generalmente forman parte de los criterios de aceptabilidad de un determinado experimento (1).

**Procedimientos normales de control de calidad**

13. Deben llevarse a cabo procedimientos normales de control de calidad, tal como se describe para cada ensayo, a fin de garantizar que la línea celular se mantiene estable a lo largo de varios pases, exenta de micoplasmas (es decir, libre de contaminación bacteriana), y conserva a lo largo del tiempo la capacidad de proporcionar las respuestas esperadas mediadas por ER. Las líneas celulares deben someterse a un control adicional para comprobar su identidad correcta, así como para detectar la eventual presencia de otros contaminantes (por ejemplo, hongos, levaduras y virus).

**Demostración de la competencia del laboratorio**

14. Antes de someter productos desconocidos a alguno de los ensayos con arreglo al presente método de ensayo, cada laboratorio debe demostrar su competencia para utilizar el ensayo. Para demostrar tal competencia, cada laboratorio debe probar las catorce sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el cuadro 3 en relación con el ensayo de agonistas y las diez sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el cuadro 4 en relación con el ensayo de antagonistas. Esta prueba de la competencia también confirmará la sensibilidad del sistema de ensayo. La lista de sustancias para la prueba de la competencia es un subconjunto de las sustancias de referencia que figuran en las normas de comportamiento relativas a los ensayos ER TA (6). Estas sustancias están disponibles en el mercado, representan las clases de productos normalmente asociadas con la actividad agonista o antagonista ER, presentan una gama adecuada de potencia esperada en cuanto a su actividad como agonistas/antagonistas ER (es decir, de fuerte a débil) e incluyen negativos. Los ensayos de las sustancias para la prueba de la competencia deben repetirse al menos dos veces, en diferentes días. La competencia se demuestra por la clasificación correcta (positiva/negativa) de cada sustancia para la prueba de la competencia. Cada técnico debe repetir la prueba de la competencia al aprender los ensayos. En función del tipo de células, algunas de estas sustancias para la prueba de la competencia pueden comportarse como SERM y mostrar actividad como agonistas y como antagonistas. Sin embargo, las sustancias para la prueba de la competencia se clasifican en los cuadros 3 y 4 por su actividad predominante conocida, que es la que debe utilizarse para la evaluación de la competencia.

15. Para demostrar el comportamiento y con fines de control de la calidad, cada laboratorio debe compilar bases de datos históricos de agonistas y de antagonistas con datos sobre los patrones de referencia (por ejemplo, 17β-estradiol y tamoxifeno), las sustancias testigo positivo y negativo y los controles del disolvente (por ejemplo, DMSO). En primer lugar, la base de datos debe generarse a partir de al menos diez tandas independientes con agonistas (por ejemplo, 17β-estradiol) y diez tandas independientes con antagonistas (por ejemplo, tamoxifeno). Deben añadirse los resultados de futuros análisis de estos patrones de referencia y controles del disolvente para ampliar la base de datos a fin de garantizar la coherencia y el comportamiento del bioensayo realizado por el laboratorio a lo largo del tiempo.

▼M8

*Cuadro 3*

**Lista de catorce sustancias para la prueba de la competencia con el ensayo de agonistas** [1]

| N.º [8] | Sustancia | N.º CAS | Respuesta prevista [2] | Ensayo STTA | | | Ensayo VM7Luc ER TA | | Clase química del sistema MeSH [6] | Clase de producto [7] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Valor de $CP_{10}$ (M) [3] | Valor de $CP_{50}$ (M) [3] | Intervalo conc. ensayo (M) | Valor de $CE_{50}$ en VM7Luc (M) [4] | Conc. máxima en la determinación del intervalo (M) [5] | | |
| 14 | Dietilestilbestrol | 56-53-1 | POS | $< 1{,}00 \times 10^{-11}$ | $2{,}04 \times 10^{-11}$ | $10^{-14} – 10^{-8}$ | $3{,}34 \times 10^{-11}$ | $3{,}73 \times 10^{-4}$ | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 12 | 17α-Estradiol | 57-91-0 | POS | $4{,}27 \times 10^{-11}$ | $6{,}44 \times 10^{-10}$ | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $1{,}40 \times 10^{-9}$ | $3{,}67 \times 10^{-3}$ | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 15 | *meso*-Hexestrol | 84-16-2 | POS | $< 1{,}00 \times 10^{-11}$ | $2{,}75 \times 10^{-11}$ | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $1{,}65 \times 10^{-11}$ | $3{,}70 \times 10^{-3}$ | Hidrocarburos (cíclicos), fenoles | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 11 | 4-*terc*-Octilfenol | 140-66-9 | POS | $1{,}85 \times 10^{-9}$ | $7{,}37 \times 10^{-8}$ | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $3{,}19 \times 10^{-8}$ | $4{,}85 \times 10^{-3}$ | Fenoles | Productos intermedios |
| 9 | Genisteína | 446-72-0 | POS | $2{,}24 \times 10^{-9}$ | $2{,}45 \times 10^{-8}$ | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $2{,}71 \times 10^{-7}$ | $3{,}70 \times 10^{-4}$ | Flavonoides, compuestos heterocíclicos | Productos naturales, productos farmacéuticos |
| 6 | Bisfenol A | 80-05-7 | POS | $2{,}02 \times 10^{-8}$ | $2{,}94 \times 10^{-7}$ | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $5{,}33 \times 10^{-7}$ | $4{,}38 \times 10^{-3}$ | Fenoles | Productos intermedios |

▼M8

| N.º ([8]) | Sustancia | N.º CAS | Respuesta prevista ([2]) | Ensayo STTA | | | Ensayo VM7Luc ER TA | | Clase química del sistema MeSH ([6]) | Clase de producto ([7]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Valor de $CP_{10}$ (M) ([3]) | Valor de $CP_{50}$ (M) ([3]) | Intervalo conc. ensayo (M) | Valor de $CE_{50}$ en VM7Luc (M) ([4]) | Conc. máxima en la determinación del intervalo (M) ([5]) | | |
| 2 | Canferol | 520-18-3 | POS | $1{,}36 \times 10^{-7}$ | $1{,}21 \times 10^{-6}$ | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $3{,}99 \times 10^{-6}$ | $3{,}49 \times 10^{-3}$ | Flavonoides, compuestos heterocíclicos | Productos naturales |
| 3 | Ftalato de butilbencilo | 85-68-7 | POS | $1{,}14 \times 10^{-6}$ | $4{,}11 \times 10^{-6}$ | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $1{,}98 \times 10^{-6}$ | $3{,}20 \times 10^{-4}$ | Ácidos carboxílicos, ésteres, ácido ftalico | Plastificantes, productos industriales |
| 4 | *p*,*p*'-Metoxicloro | 72-43-5 | POS | $1{,}23 \times 10^{-6}$ | — | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $1{,}92 \times 10^{-6}$ | $2{,}89 \times 10^{-3}$ | Hidrocarburos (halogenados) | Plaguicidas, productos veterinarios |
| 1 | Etilparabeno | 120-47-8 | POS | $5{,}00 \times 10^{-6}$ | — | $10^{-11} – 10^{-5}$ | $2{,}48 \times 10^{-5}$ | $6{,}02 \times 10^{-3}$ | Ácidos carboxílicos, ésteres | Productos farmacéuticos, conservantes |
| 17 | Atrazina | 1912-24-9 | NEG | — | — | $10^{-10} – 10^{-4}$ | — | $4{,}64 \times 10^{-4}$ | Compuestos heterocíclicos | Herbicidas |
| 20 | Espironolactona | 52-01-7 | NEG | — | — | $10^{-11} – 10^{-5}$ | — | $2{,}40 \times 10^{-3}$ | Lactonas, esteroides | Productos farmacéuticos |
| 21 | Ketoconazol | 65277-42-1 | NEG | — | — | $10^{-11} – 10^{-5}$ | — | $9{,}41 \times 10^{-5}$ | Compuestos heterocíclicos | Productos farmacéuticos |

▼M8

| N.º ([8]) | Sustancia | N.º CAS | Respuesta prevista ([2]) | Ensayo STTA | | | Ensayo VM7Luc ER TA | | Clase química del sistema MeSH ([6]) | Clase de producto ([7]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Valor de $CP_{10}$ (M) ([3]) | Valor de $CP_{50}$ (M) ([3]) | Intervalo conc. ensayo (M) | Valor de $CE_{50}$ en VM7Luc (M) ([4]) | Conc. máxima en la determinación del intervalo (M) ([5]) | | |
| 22 | Reserpina | 50-55-5 | NEG | — | — | $10^{-11}$ – $10^{-5}$ | — | $1{,}64 \times 10^{-3}$ | Compuestos heterocíclicos, indoles | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; $CE_{50}$ = concentración de la sustancia problema que produce la mitad del efecto máximo; NEG = negativo; POS = positivo; $CP_{10}$ (y $CP_{50}$) = concentración de una sustancia problema a la que la respuesta es del 10 % (o del 50 % en el caso de la $CP^{50}$) de la respuesta inducida por el testigo positivo (E2, 1 nm) en cada placa.

([1]) La clasificación como positivo o negativo respecto a la actividad de agonista ER se basó en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM sobre los ensayos de unión a los ER y TA (31), así como en datos empíricos y otra información obtenida de estudios de referencia publicados y revisados tras la finalización de dichos documentos del ICCVAM (2) (3) (18) (31) (32) (33) (34).

([2]) Valores comunicados en el proyecto de informe de prevalidación y de validación interlaboratorios del ensayo de activación transcripcional (TA) transfectada establemente para detectar actividad estrogénica - ensayo de gen marcador mediado por el receptor estrogénico alfa humano utilizando la línea celular hER-HeLa-9903 (30).

([3]) Los valores medios de la $CE_{50}$ se calcularon con los valores comunicados por los laboratorios del estudio de validación VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, y Hiyoshi) (3).

([4]) Las concentraciones indicadas son las concentraciones más altas objeto de ensayo (determinación del intervalo) durante la validación del ensayo VM7Luc ER TA. Si las concentraciones difieren entre los laboratorios, se comunica la concentración más elevada. Véase el cuadro 4-10 del Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): ensayo in vitro para identificar la actividad agonista y antagonista de los receptores estrogénicos humanos de los productos (3).

([5]) Las sustancias se asignaron a una o varias clases químicas con arreglo al U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), que es un sistema de clasificación normalizado internacionalmente reconocido (disponible en: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Las sustancias se asignaron a una o varias clases de producto con arreglo al banco de datos U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponible en http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/).

([7]) Del cuadro 1 [Lista de productos de referencia (22) para la evaluación de la exactitud de los agonistas ER] de las normas de comportamiento (6).

([8]) Si una sustancia para la prueba de la competencia deja de estar disponible en el comercio, puede utilizarse una sustancia con la misma clasificación y de potencia, modo de acción y clase química comparables.

▼M8

*Cuadro 4*

**Lista de diez sustancias para la prueba de la competencia con el ensayo de antagonistas**

| | Sustancia ([a]) | N.º CAS | Ensayo ER STTA ([1]) | | | Ensayo VM7Luc ER TA ([2]) | | | Efectos candidatos del ER STTA ([1]) | Clasificación de consenso del IC-CVAM ([5]) | Clase química del MeSH ([6]) | Clase de producto ([7]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Actividad ER TA | $CI_{50}$ (M) | Intervalo conc. ensayo (M) | Actividad ER TA | $CI_{50}$ ([3]) (M) | Conc. máxima en la determinación del intervalo (M) ([4]) | | | | |
| 1 | 4-Hidroxitamoxifeno | 68047-06-3 | POS | $3{,}97 \times 10^{-9}$ | $10^{-12} – 10^{-7}$ | POS | $2{,}08 \times 10^{-7}$ | $2{,}58 \times 10^{-4}$ | POS moderado | POS | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos |
| 2 | Raloxifeno HCl | 82640-04-8 | POS | $7{,}86 \times 10^{-10}$ | $10^{-12} – 10^{-7}$ | POS | $1{,}19 \times 10^{-9}$ | $1{,}96 \times 10^{-4}$ | POS moderado | POS | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos |
| 3 | Tamoxifeno | 10540-29-1 | POS | $4{,}91 \times 10^{-7}$ | $10^{-10} – 10^{-5}$ | POS | $8{,}17 \times 10^{-7}$ | $2{,}69 \times 10^{-4}$ | POS | POS | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos |
| 4 | 17β-Estradiol | 50-28-2 | NEG | — | $10^{-9} – 10^{-4}$ | NEG | — | $3{,}67 \times 10^{-3}$ | Previsto que sea negativo (*) | SN | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 5 | Apigenina | 520-36-5 | NEG | — | $10^{-9} – 10^{-4}$ | NEG | — | $3{,}70 \times 10^{-4}$ | NEG | NEG | Compuestos heterocíclicos | Colorantes, productos naturales, productos intermedios farmacéuticos |
| 6 | Ftalato de di-n-butilo | 84-74-2 | NEG | — | $10^{-8} – 10^{-3}$ | NEG | — | $3{,}59 \times 10^{-3}$ | NEG | NEG | Ésteres, ácido ftálico | Ingredientes de cosméticos, productos industriales, plastificantes |

▼M8

| | Sustancia ([a]) | N.º CAS | Ensayo ER STTA ([1]) | | | Ensayo VM7Luc ER TA ([2]) | | | Efectos candidatos del ER STTA ([1]) | Clasificación de consenso del IC-CVAM ([5]) | Clase química del MeSH ([6]) | Clase de producto ([7]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Actividad ER TA | $CI_{50}$ (M) | Intervalo conc. ensayo (M) | Actividad ER TA | $CI_{50}$ ([3]) (M) | Conc. máxima en la determinación del intervalo (M) ([4]) | | | | |
| 7 | Flavona | 525-82-6 | NEG | — | $10^{-8} – 10^{-3}$ | NEG | — | $4{,}50 \times 10^{-4}$ | Previsto que sea negativo (*) | SN | Flavonoides, compuestos heterocíclicos | Productos naturales, productos farmacéuticos |
| 8 | Genisteína | 446-72-0 | NEG | — | $10^{-9} – 10^{-4}$ | NEG | — | $3{,}70 \times 10^{-4}$ | Previsto que sea negativo (*) | NEG | Flavonoides, compuestos heterocíclicos | Productos naturales, productos farmacéuticos |
| 9 | *p*-n-Nonilfenol | 104-40-5 | NEG | — | $10^{-9} – 10^{-4}$ | NEG | — | $4{,}54 \times 10^{-4}$ | No se ha ensayado | NEG | Fenoles | Productos intermedios |
| 10 | Resveratrol | 501-36-0 | NEG | — | $10^{-8} – 10^{-3}$ | NEG | — | $4{,}38 \times 10^{-4}$ | Previsto que sea negativo (*) | NEG | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos naturales |

Abreviaturas: N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; M = molar; $CI_{50}$ = concentración de la sustancia problema que produce la mitad de la inhibición máxima; NEG = negativo; SP = supuesto negativo; POS = positivo;

(*) Clasificado como negativo según la revisión de la bibliografía (2).

([a]) Sustancias comunes objeto de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA, que se calificaron como antagonistas ER o negativos y se utilizaron para evaluar la exactitud en el informe de validación del VM7Luc ER TA (2) (3).

([1]) Informe de validación del ensayo de activación transcripcional transfectada establementepara detectar actividad mediada por ER, parte B (2).

([2]) Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): método *in vitro* para identificar agonistas y antagonistas ER (3).

([3]) Los valores medios de la $CI_{50}$ se calcularon con los valores comunicados por los laboratorios del estudio de validación VM7Luc ER TA (XDS, ECVAM, y Hiyoshi) (3).

([4]) Las concentraciones indicadas son las concentraciones más altas objeto de ensayo (determinación del intervalo) durante la validación del ensayo VM7Luc ER TA. Si las concentraciones difieren entre los laboratorios, se comunica la concentración más elevada. Véase el cuadro 4-11 del Informe de evaluación de métodos de ensayo del ICCVAM sobre el método de ensayo LUMI-CELL® ER (VM7Luc ER TA): ensayo in vitro para identificar la actividad agonista y antagonista de los receptores estrogénicos humanos de los productos (3).

([5]) La clasificación como antagonista ER o negativo se basó en la información contenida en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM (BRD) sobre los método s de ensayo de unión a los ER y TA (31), así como en la información obtenida de las publicaciones publicadas y revisadas tras la finalización de los BRD del ICCVAM (2) (3) (18) (31).

([6]) Las sustancias se asignaron a una o varias clases químicas con arreglo al U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), que es un sistema de clasificación normalizado internacionalmente reconocido (http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([7]) Las sustancias se asignaron a una o varias clases de producto con arreglo al banco de datos U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponible en http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB).

▼M8

**Criterios de aceptabilidad de las tandas de ensayo**

16. La aceptación o el rechazo de una tanda de ensayo se basa en la evaluación de los resultados obtenidos con los patrones de referencia y los testigos utilizados para cada experimento. Los valores correspondientes a $CP_{50}$ ($CE_{50}$) o $CI_{50}$ de los patrones de referencia deben cumplir los criterios de aceptabilidad establecidos para el ensayo seleccionado (para el STTA véase el apéndice 2, para el VM7Luc TA véase el apéndice 3), y todos los testigos positivos o negativos deben clasificarse correctamente con cada experimento aceptado. La capacidad de realizar el ensayo de forma coherente debe demostrarse mediante la elaboración y el mantenimiento de una base de datos históricos sobre los patrones de referencia y los testigos (véase el punto 15). Las desviaciones típicas (DT) o los coeficientes de variación (CV) de las medias de los parámetros de ajuste de la curva de los patrones de referencia a partir de experimentos múltiples pueden utilizarse como medida de la reproducibilidad intralaboratorios. Además, deben cumplirse los siguientes principios en relación con los criterios de aceptabilidad:

— Los datos deben ser suficientes para una evaluación cuantitativa de la activación del ER (para el ensayo de agonistas) o de su supresión (para el ensayo de antagonistas) (es decir, eficacia y potencia).

— La actividad media del marcador correspondiente a la concentración de referencia del estrógeno de referencia debe ser, al menos, la mínima especificada en los ensayos en relación con la del control del vehículo (disolvente) para garantizar una sensibilidad adecuada. En los ensayos STTA y VM7Luc ER TA, esto es cuatro veces el valor de la media del control del vehículo en cada placa.

— Las concentraciones ensayadas deben mantenerse dentro del intervalo de solubilidad de los productos problema y no mostrar citotoxicidad.

**Análisis de los datos**

17. Para clasificar una respuesta como positiva y negativa debe utilizarse el procedimiento definido de interpretación de datos correspondiente a cada ensayo.

18. El cumplimiento de los criterios de aceptabilidad (punto 16) indica que el ensayo funciona correctamente, pero no garantiza que cualquier tanda de ensayo concreta produzca datos exactos. La reproducción de los resultados de la primera tanda es la mejor indicación de que se han producido datos exactos. Si dos tandas dan resultados reproducibles (por ejemplo, si los resultados de ambas tandas de ensayo indican que es positivo un producto problema), no es necesario realizar una tercera tanda.

19. Si no se obtienen resultados reproducibles en dos tandas (por ejemplo, un producto problema es positivo en una sola tanda y negativo en la otra), o si es necesario un grado de certeza más elevado en relación con el resultado de este ensayo, deben realizarse al menos tres tandas independientes. En este caso, la clasificación se basa en los dos resultados concordantes de los tres.

**Criterios generales de interpretación de los datos**

20. Actualmente no se dispone de un método aceptado universalmente para interpretar los datos del ensayo ER TA. Sin embargo, tanto las evaluaciones cualitativas (por ejemplo, positivo/negativo) como las cuantitativas (por ejemplo, $CE_{50}$, $CP_{50}$, $CI_{50}$) de la actividad mediada por ER deben basarse en datos empíricos y en un sólido juicio científico. Cuando sea posible, los resultados positivos deben caracterizarse tanto por la magnitud del efecto en comparación con el control del vehículo (disolvente) o el estrógeno de referencia como por la concentración a la que se produce el efecto (por ejemplo, $CE_{50}$, $CP_{50}$, $RCP_{Máx}$, $CI_{50}$, etc.).

▼**M8**

**Informe del ensayo**

21. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Ensayo:*

— ensayo utilizado;

— testigo/ patrón de referencia / producto problema;

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

— estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

— medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

*Sustancias de un solo componente:*

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

*Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:*

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Disolvente o vehículo:*

— caracterización (naturaleza, proveedor y lote);

— justificación de la elección del disolvente o vehículo;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen.

*Células:*

— tipo y origen de las células;

  • ¿Se expresa el ER de forma endógena? En caso contrario, ¿qué receptor o receptores se han transfectado?

  • Construcción o construcciones marcadoras utilizadas (incluyendo las especies origen);

  • Método de transfección;

  • Método de selección para mantener la transfección estable (cuando proceda);

  • ¿Es pertinente para las líneas estables el método de transfección?

— número de pases celulares (después de la descongelación);

▼**M8**

— número del pase de las células en el momento de la descongelación;

— métodos de mantenimiento de los cultivos celulares.

*Condiciones del ensayo:*

— limitaciones de la solubilidad;

— descripción de los métodos de evaluación de la viabilidad aplicados;

— composición de los medios, concentración de $CO_2$;

— concentración del producto problema;

— volúmenes de vehículo y de producto problema añadidos;

— temperatura y humedad de la incubación;

— duración del tratamiento;

— densidad celular al principio del tratamiento y durante este;

— patrones de referencia positivos y negativos;

— reactivos del marcador (nombre del producto, proveedor y lote);

— criterios empleados para considerar que las tandas de ensayo son positivas, negativas o dudosas.

*Comprobación de la aceptabilidad:*

— factor de inducción para cada placa de ensayo y si cumple el mínimo requerido por el ensayo sobre la base de los controles históricos;

— valores reales para los criterios de aceptabilidad, por ejemplo valores de $\log_{10} CE_{50}$, $\log_{10} CP_{50}$, log $CI_{50}$ y pendiente de Hill, correspondientes a los testigos positivos en paralelo y a los patrones de referencia.

*Resultados:*

— datos en bruto y normalizados;

— nivel máximo del factor de inducción;

— datos de citotoxicidad;

— si existe, concentración efectiva mínima ($CE_{Min}$);

— $RCP_{Máx}$, $CP_{Máx}$, $CP_{50}$, $CI_{50}$ y/o $CE_{50}$, según corresponda;

— relación concentración-respuesta, cuando sea posible;

▼M8

— análisis estadísticos, en su caso, junto con una medida del error y de la confianza (por ejemplo, SEM, DT, CV o IC del 95 %) y una descripción de cómo se han obtenido dichos valores.

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(2) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(3) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method, an *In Vit*ro Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(4) Pujol P. *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer. Res., 58(23): p. 5367-73.

(5) Rogers J.M. and Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals, *In Vitro* and Molecular Toxicology: Journal of Basic and Applied Research, 13(1): p. 67-82.

(6) OCDE (2012). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Agonists (for TG 455). Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 173), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(7) OCDE (2015). Performance Standards For Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assay to Detect Estrogen Receptor Antagonists. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 174), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(8) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(9) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept. Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20- 6.

(10) Welboren W.J. *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and how are they Regulated? Endocr. Relat. Cancer, 16(4): p. 1073-89.

(11) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. Pathol. Lab. Med., 135(1): p. 63- 6.

▼**M8**

(12) Jefferson W.N., *et al.* (2002). Assessing Estrogenic Activity of Phytochemicals Using Transcriptional Activation and Immature Mouse Uterotrophic Responses, Journal of Chromatography B, 777(1-2): p. 179-189.

(13) Sonneveld E. *et al.* (2006). Comparison of I*n Vitro* and *In Vivo* Screening Models for Androgenic and Estrogenic Activities, *Toxicol*. Sci., 89(1): p. 173-187.

(14) Takeyoshi M. *et al.* (2002). The Efficacy of Endocrine Disruptor Screening Tests in Detecting Anti- Estrogenic Effects Downstream of Receptor-Ligand Interactions, Toxicology Letters, 126(2): p. 91- 98.

(15) Combes R.D. (2000). Endocrine Disruptors: a Critical Review of *In Vitro* and *In Vivo* Testing Strategies for Assessing their Toxic Hazard to Humans, ATLA Alternatives to Laboratory Animals,28(1): p. 81-118.

(16) Escande A. *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. Pharmacol,71(10): p. 1459-69.

(17) Gray L.E. Jr. (1998). Tiered Screening and Testing Strategy for Xenoestrogens and Antiandrogens, *Toxicol*. Lett, 102-103, 677-680.

(18) EDSTAC (1998). Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report.

(19) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(20) Gustafsson J.Ö. (1999). Estrogen Receptor ß - A New Dimension in Estrogen Mechanism of Action, Journal of Endocrinology, 163(3): p. 379-383.

(21) Ogawa S. *et al.* (1998). The Complete Primary Structure of Human Estrogen Receptor ß (hERß) and its Heterodimerization with ERα *In Vivo* and *In Vitro,* Biochemical and Biophysical Research Communications, 243(1): p. 122-126.

(22) Enmark E. *et al.* (1997). Human Estrogen Receptor ß-Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism,82(12): p. 4258-4265.

(23) Ball L.J. *et al.* (2009). Cell Type- and Estrogen Receptor-Subtype Specific Regulation of Selective Estrogen Receptor Modulator Regulatory Elements, Molecular and Cellular Endocrinology, 299(2): p. 204-211.

(24) Barkhem T. *et al.* (1998). Differential Response of Estrogen Receptor Alpha and Estrogen Receptor Beta to Partial Estrogen Agonists/Antagonists, Mol. Pharmacol, 54(1): p. 105-12.

(25) Deroo B.J. and Buensuceso A.V. (2010). Minireview: Estrogen Receptor-ß: Mechanistic Insights from Recent Studies, Molecular Endocrinology, 24(9): p. 1703-1714.

(26) Harris D.M. *et al.* (2005). Phytoestrogens Induce Differential Estrogen Receptor Alpha- or Beta- Mediated Responses in Transfected Breast Cancer Cells, Experimental Biology and Medicine, 230(8): p. 558-568.

(27) Anderson J.N. Clark J.H. and Peck E.J.Jr. (1972). The Relationship Between Nuclear Receptor- Estrogen Binding and Uterotrophic Responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 48(6): p. 1460-1468.

▼**M8**

(28) Toft D. (1972). The Interaction of Uterine Estrogen Receptors with DNA, Journal of Steroid Biochemistry, 3(3): p. 515-522.

(29) Gorski J. *et al.* (1968), Hormone Receptors: Studies on the Interaction of Estrogen with the Uterus, Recent Progress in Hormone Research, 24: p. 45-80.

(30) Jensen E.V. *et al.* (1967), Estrogen-Receptor Interactions in Target Tissues, Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale, 56(3):p. 547-569.

(31) ICCVAM (2002). Background Review Document: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (TA) Assay. Appendix D, Substances Tested in the ER TA Assay, NIH Publication Report (No 03-4505.).

(32) Kanno J. *et al.* (2001). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *In Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1, Environ. Health Persp., 109:785-94.

(33) Kanno J. *et al.* (2003). The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two Dose -Response Studies, Environ. Health Persp., 111:1530-1549.

(34) Kanno J. *et al.* (2003), The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase Two – Coded Single-Dose Studies, Environ. Health Persp., 111:1550-1558.

(35) Geisinger *et al.* (1989) Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(36) Baldwin *et al.* (1998) BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(37) Li, Y. *et al.* (2014) Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(38) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000) Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

**Criterios de aceptabilidad**: Normas mínimas para la realización de controles experimentales y patrones de referencia. Para que un experimento se considere válido deben cumplirse todos los criterios de aceptabilidad.

**Exactitud (concordancia)**: Grado de coincidencia entre los resultados de un ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un ensayo (1).

**Agonista**: Sustancia que produce una respuesta, por ejemplo transcripción, cuando se une a un receptor específico.

**Antagonista**: Tipo de producto o de ligando de un receptor que no provoca una respuesta biológica en sí como consecuencia de su unión a un receptor, sino que bloquea o amortigua las respuestas mediadas por los agonistas.

**Actividad antiestrogénica**: Capacidad de un producto de suprimir la acción del 17β-estradiol mediada a través de receptores estrogénicos.

**Morfología celular**: Forma y aspecto de las células cultivadas en una monocapa en un solo pocillo de una placa de cultivo de tejidos. Las células que están muriendo suelen presentar una morfología celular anormal.

**MC**: Marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos.

**Tratamiento de carbón/dextrano**: Tratamiento del suero utilizado en el cultivo celular. El tratamiento con carbón/dextrano (a menudo denominado «separación») elimina las hormonas endógenas y las proteínas de unión de hormonas.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Citotoxicidad**: Efectos nocivos para la estructura o la función celular que pueden finalmente causar la muerte de las células y puede reflejarse mediante una reducción del número de células presentes en el pocillo al final del período de exposición o mediante una reducción de la capacidad respecto a una medida de la función celular en comparación con el control en paralelo del vehículo.

**CV**: Coeficiente de variación.

**DCC-FBS**: Suero bovino fetal tratado con carbón recubierto de dextrano.

**DMEM**: Modificación de Dulbecco del medio de Eagle.

**DMSO**: Dimetilsulfóxido.

**E2**: 17β-estradiol.

$\mathbf{CE_{50}}$: Concentración del producto problema que produce la mitad del efecto máximo.

**AE**: Alteración endocrina.

**hERα**: Receptor estrogénico humano alfa.

▼M8

**hERß**: Receptor estrogénico humano beta.

**EFM**: Medio libre de estrógenos. Modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM), complementado con 4,5 % de FBS tratado con carbón/dextrano, 1,9 % de L-glutamina y 0,9 % de Pen-Strep (penicilina-estreptomicina).

**ER**: Receptor estrogénico.

**ERE**: Elemento de respuesta a estrógenos.

**Actividad estrogénica**: Capacidad de un producto para imitar al 17β-estradiol en su posibilidad de unirse a los receptores estrogénicos y activarlos. La actividad estrogénica mediada por hERα puede detectarse con este método de ensayo.

**ERTA**: Transactivación de los receptores estrogénicos.

**FBS**: Suero bovino fetal.

**HeLa**: Línea celular de cuello de útero humana inmortal.

**HeLa9903**: Un subclón de la línea celular HeLa al que se han transfectado de forma estable un gen marcador de la luciferasa y hERαα.

**$CI_{50}$**: Concentración del producto problema que produce la mitad de la inhibición máxima.

**ICCVAM**: Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos de Estados Unidos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

**Reproducibilidad interlaboratorios**: Medida del grado en que distintos laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias, pueden producir resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (1).

**Reproducibilidad intralaboratorios**: Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (1).

**$CE_{Min}$**: Concentración efectiva mínima; es la concentración más baja del producto problema que produce una respuesta (es decir, la concentración más baja del producto problema en la que el factor de inducción es estadísticamente diferente al del control del vehículo en paralelo).

**Ensayos de imitación**: Expresión coloquial para denominar los ensayos que son estructural y funcionalmente similares a un método de ensayo de referencia validado y aceptado. También se pueden denominar métodos de ensayo similares.

**MT**: Metalotioneína.

**MMTV**: Virus de tumor mamario de ratón.

**OHT**: 4-Hidroxitamoxifeno.

**PBTG**: Directrices de ensayo basadas en el comportamiento.

▼M8

**TP** (testigo positivo):: Sustancia muy activa, de preferencia el 17ß-estradiol, que se incluye en todos los ensayos para contribuir a garantizar el buen funcionamiento de estos.

**$CP_{10}$**: Concentración de un producto problema a la que la actividad medida en un ensayo de agonistas es el 10 % de la actividad máxima inducida por el TP (E2 1 nM en el ensayo STTA) en cada placa.

**$CP_{50}$**: Concentración de un producto problema a la que la actividad medida en un ensayo de agonistas es el 50 % de la actividad máxima inducida por el TP (E2 a la concentración de referencia especificada en el método de ensayo) en cada placa.

**$CP_{Máx}$**: Concentración a la que un producto problema induce la $RCP_{Máx}$.

**Normas de comportamiento**: Normas, basadas en un ensayo validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluye lo siguiente: 1) los componentes esenciales del ensayo; 2) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y 3) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (1).

**Sustancias para la prueba de la competencia**: Subconjunto de las sustancias de referencia incluidas en las normas de comportamiento que pueden ser utilizadas por los laboratorios para demostrar la competencia técnica con un método de ensayo normalizado. Los criterios de selección de estas sustancias suelen incluir que representen la gama de respuestas, que estén disponibles en el mercado y que se disponga sobre ellas de datos de referencia de alta calidad.

**Competencia**: Capacidad demostrada de realizar correctamente un ensayo antes de someter a este sustancias desconocidas.

**Estrógeno de referencia (testigo positivo, TC)**: 17β-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

**Patrón de referencia**: Sustancia de referencia utilizada para demostrar la adecuación de un ensayo. El 17β-estradiol es el patrón de referencia de los ensayos STTA y VM7Luc ER TA.

**Métodos de ensayo de referencia**: Ensayos sobre los que se basan las PBTG 455.

**Pertinencia**: Descripción de la relación de un ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un ensayo (1).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios.

**ULR**: Unidades luminosas relativas.

**ARN**: Ácido ribonucleico.

**$RCP_{Máx}$**: Nivel máximo de respuesta inducido por un producto problema, expresado como porcentaje de la respuesta inducida por la solución 1 nM de E2 en la misma placa.

▼M8

**RPMI**: Medio RPMI 1 640 complementado con 0,9 % de Pen-Strep y 8,0 % de suero bovino fetal (FBS).

**Tanda**: Experimento individual que evalúa la acción del producto sobre los resultados biológicos del ensayo. Cada tanda es un experimento completo realizado en pocillos replicados de células cultivadas a partir de un conjunto común de células al mismo tiempo.

**Tanda independiente**: Experimento aparte e independiente que evalúa la acción del producto sobre los resultados biológicos del ensayo, utilizando células procedentes de un conjunto diferente y productos recién diluidos, realizada en días distintos o el mismo día por personal diferente.

**DT**: Desviación típica.

**Sensibilidad**: Proporción de todas las sustancias activas/positivas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (1).

**Especificidad**: Proporción de todas las sustancias inactivas/negativas que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (1).

**Transfección estable**: Cuando se transfecta ADN a células cultivadas de tal manera que se integra de forma estable en el genoma de las células, dando lugar a la expresión estable de genes transfectados. Los clones de células transfectadas de forma estable se seleccionan mediante marcadores estables (por ejemplo, resistencia al antibiótico G418).

**Ensayo STTA**: Ensayo de transactivación transfectada establemente, que es el ensayo de activación transcripcional ERα en el que se utiliza la línea celular HeLa 9 903.

**Estudio**: Todo el conjunto de trabajo experimental realizado para evaluar una única sustancia específica mediante un ensayo específico. El estudio comprende todas las fases, incluidos los ensayos de dilución de la sustancia problema en los medios de ensayo, las tandas de determinación preliminar del intervalo, todas las tandas completas necesarias, los análisis de datos, la garantía de calidad, las evaluaciones de la citotoxicidad, etc. La realización de un estudio permite clasificar la actividad del producto problema en relación con la diana de toxicidad (es decir, activo, inactivo o no concluyente) que se evalúa mediante el ensayo utilizado y una estimación de la potencia relativa al producto de referencia positivo.

**Sustancia**: Según REACH ([1]), una sustancia se define como un elemento químico y sus compuestos naturales o los obtenidos mediante algún proceso industrial, incluidos los aditivos necesarios para conservar su estabilidad y las impurezas que inevitablemente se produzcan en el proceso, con exclusión de todos los disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición. En el contexto del SGA de las Naciones Unidas se utiliza una definición muy similar (1).

**TA (transactivación)**: Inicio de la síntesis de ARNm en respuesta a una señal química específica, como la fijación de un estrógeno al receptor estrogénico.

([1]) Reglamento (CE) n.º 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n.º 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n.º 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. (DO L 304 de 22.11.2007, p. 1).

▼**M8**

**Ensayo**: En el contexto de este método de ensayo, un ensayo es uno de los métodos aceptados como válido por cumplir los criterios de comportamiento establecidos. Los componentes del ensayo incluyen, por ejemplo, la línea celular específica con las condiciones de crecimiento asociadas, los medios específicos en los que se realiza el ensayo, las condiciones de configuración de las placas, la disposición y las diluciones de los productos problema, junto con cualquier otra medida requerida de control de la calidad y las correspondientes fases de evaluación de los datos.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Transcripción**: Síntesis de ARNm.

**UVCB**: Sustancias químicas de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

**Método de ensayo validado**: Ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (1).

**Validación**: Proceso por el que se establece para un fin determinado la fiabilidad y pertinencia de un enfoque, método, ensayo, proceso o evaluación concretos (1).

**CVe (control del vehículo)**: El disolvente que se utiliza para disolver el producto problema y las sustancias testigo se somete a ensayo únicamente como vehículo, sin producto disuelto.

**VM7**: Células de adenocarcinoma inmortalizado que expresan de forma endógena el receptor estrogénico.

**VM7Luc4E2**: La línea celular VM7Luch4E2 se ha obtenido de células de adenocarcinoma inmortalizado de origen humano VM7 que expresan de forma endógena ambas formas del receptor estrogénico (ERα y ERβ) y se han transfectado establemente con el plásmido pGudLuc7.ERE. Este plásmido contiene cuatro copias de un oligonucleótido sintético que incluye el elemento de respuesta a estrógenos en dirección 5’ respecto al promotor vírico del tumor de mama del ratón (MMTV) y el gen de la luciferasa de la luciérnaga.

**Testigo positivo débil**: Sustancia débilmente activa, seleccionada de la lista de productos de referencia y que se incluye en todos los ensayos para contribuir a garantizar el buen funcionamiento de estos.

▼**M8**

*Apéndice 2*

ENSAYO DE TRANSACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO A HUMANO TRANSFECTADO ESTABLEMENTE PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD AGONISTA Y ANTAGONISTA DE LOS PRODUCTOS, UTILIZANDO LA LÍNEA CELULAR HERA-HELA-9903

CONSIDERACIONES Y LIMITACIONES INICIALES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo de transactivación (TA) utiliza la línea celular hERα-HeLa-9903 para detectar la actividad de agonistas estrogénicos mediada a través del receptor estrogénico humano alfa (hERα). El estudio de validación del ensayo de transactivación transfectada establemente (STTA), realizado por el Instituto Japonés de Evaluación e Investigación de Productos Químicos (CERI) utilizando la línea celular hERα-HeLa-9903 para detectar la actividad estrogénica agonista y antagonista mediada a través del receptor estrogénico humano alfa (hERα), demostró la pertinencia y fiabilidad del ensayo para su fin previsto (1).

2. Este ensayo está diseñado específicamente para detectar la TA mediada a través del hERα midiendo la quimioluminiscencia como parámetro. Sin embargo, se han comunicado señales de luminiscencia no mediadas por el receptor a concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 μM como consecuencia de la sobreactivación del gen marcador de la luciferasa (2) (3). Si bien la curva dosis-respuesta indica que la activación real del sistema ER se produce a concentraciones más bajas, debe examinarse detenidamente la expresión de la luciferasa obtenida a altas concentraciones de fitoestrógenos o de compuestos similares sospechosos de producir una sobreactivación de tipo fitoestrogénico del gen marcador de la luciferasa, en los sistemas de ensayo ER TA transfectados de forma estable (apéndice 1).

3. Las secciones «INTRODUCCIÓN GENERAL» y «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA» deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en las presentes directrices de ensayo se recogen en el apéndice 2.1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

4. El ensayo se utiliza para detectar la unión del receptor estrogénico con un ligando. Tras la unión del ligando, el complejo receptor-ligando se traslada al núcleo, donde se une a determinados elementos específicos de respuesta del ADN y transactiva un gen marcador de la luciferasa de la luciérnaga, lo que provoca un aumento de la expresión celular de la enzima luciferasa. La luciferina constituye un sustrato que es transformado por la enzima luciferasa en un producto de bioluminiscencia que puede medirse cuantitativamente con un luminómetro. La actividad de la luciferasa puede evaluarse de forma rápida y poco costosa con varios equipos de pruebas disponibles en el comercio.

5. El sistema de ensayo utiliza la línea celular de hERα-HeLa-9903, procedente de un tumor de cuello de útero humano, con dos construcciones introducidas de forma estable: i) la construcción de expresión de hERαα (que codifica el receptor humano completo), y ii) la construcción del marcador de la luciferasa de la luciérnaga, que lleva cinco repeticiones en tándem de un elemento sensible a los estrógenos (ERE, *Estrogen-Responsive Element*) de vitelogenina movilizado por un elemento TATA del promotor de metalotioneína (MT) del ratón. Se ha demostrado que la construcción génica MT TATA del ratón tiene el mejor comportamiento, por lo que se utiliza normalmente. Por consiguiente, esta línea celular hERα-HeLa-9903 puede medir la capacidad de un producto problema para inducir la transactivación mediada por hERα de la expresión del gen de la luciferasa.

▼M8

6. En el caso de un ensayo de agonistas ER, la interpretación de los datos se basa en si el nivel máximo de respuesta inducida por un producto problema es igual o mayor al de una respuesta de agonistas igual al 10 % de la inducida por una concentración inductora máxima (1 nM) del testigo positivo (TP) 17β-estradiol (E2) (es decir, la $CP_{10}$). En el caso de un ensayo de antagonistas ER, la interpretación de los datos se basa en si la respuesta muestra al menos una reducción del 30 % de la actividad respecto a la respuesta inducida por el control con el testigo añadido (solución 25 pM de E2) sin citotoxicidad. El análisis y la interpretación de los datos se detallan en los puntos 34 a 48.

PROCEDIMIENTO

**Líneas celulares**

7. Debe utilizarse para el ensayo la línea celular hERα-HeLa-9903, transfectada de forma estable. La línea celular puede obtenerse del banco de células de la Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) ([1]), previa firma de un acuerdo de transferencia de material (ATM).

8. En los ensayos solo deben utilizarse células caracterizadas como libres de micoplasmas. La RCP-TR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) es el método preferido para la detección sensible de la infección por micoplasmas (4) (5) (6).

**Estabilidad de la línea celular**

9. Para supervisar la estabilidad de la línea celular, deben utilizarse el E2, el 17α-estradiol, la 17α-metiltestosterona y la corticosterona como patrones de referencia para el ensayo de agonistas, y debe obtenerse una curva completa concentración-respuesta en el intervalo de concentraciones de ensayo que figura en el cuadro 1 al menos cada vez que se realice el ensayo, y los resultados deben estar de acuerdo con los resultados proporcionados en el cuadro 1.

10. En el caso de un ensayo de antagonistas, deben medirse simultáneamente con cada tanda curvas completas de concentración correspondientes a dos patrones de referencia, tamoxifeno y flutamida. Debe supervisarse la clasificación cualitativa correcta de los dos productos como positivos o negativos.

**Condiciones de cultivo y siembra de las células**

11. Las células deben mantenerse en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) sin rojo de fenol, complementado con 60 mg/l del antibiótico kanamicina y un 10 % de suero bovino fetal tratado con carbón recubierto de dextrano (DCC-FBS), en una incubadora con $CO_2$ (5 % de $CO_2$) a 37 ± 1°C. Tras alcanzar una confluencia del 75 -90 %, se hace un subcultivo de las células con 10 ml de 0,4 x $10^5$ – 1 x $10^5$ células/ml por placa de cultivo celular de 100 mm. Las células deben suspenderse con un 10 % de FBS-EMEM (que es lo mismo que EMEM con DCCB-FBS) y, a continuación, deben depositarse en pocillos de una microplaca en la proporción de 1 x $10^4$ células (100 µl/pocillo). A continuación, las células deben preincubarse en una incubadora con 5 % de $CO_2$ a una temperatura de 37 ± 1°C durante 3 horas antes de la exposición al producto. El material de plástico debe estar libre de actividad estrogénica.

12. Para mantener la integridad de la respuesta, las células deben cultivarse durante más de un pase después del cultivo madre congelado en los medios acondicionados y no deben cultivarse durante más de cuarenta pases. En el caso de la línea celular hERα-HeLa-9903, esto significa menos de tres meses. Sin embargo, las características de las células pueden hacerse menos favorables si se cultivan en condiciones inadecuadas.

([1]) Banco de células del JCRB: National Institute of Biomedical Innovation, 7-6-8 Asagi Saito, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japón. Fax: +81-72-641-9812.

▼M8

13. El DCCB-FBS puede prepararse tal y como se describe en el apéndice 2.2 u obtenerse de fuentes comerciales.

**Criterios de aceptabilidad**

*Patrones de referencia positivos y negativos para el ensayo de agonistas ER*

14. Antes del estudio y durante el mismo, debe verificarse la sensibilidad del sistema de ensayo utilizando las concentraciones adecuadas de un estrógeno fuerte (E2), un estrógeno débil (17α-estradiol), un agonista muy débil (17α-metiltestosterona), y una sustancia negativa (corticosterona). En el cuadro 1 figuran los valores del intervalo aceptable derivados del estudio de validación (1). Estos cuatro patrones de referencia en paralelo deben incluirse en cada experimento y los resultados deben quedar dentro de los límites aceptables establecidos. En caso contrario, debe determinarse la causa del incumplimiento de los criterios de aceptabilidad (por ejemplo, manipulación de las células, o calidad y concentración de suero y antibióticos) y repetirse el ensayo. Una vez cumplidos los criterios de aceptabilidad, para garantizar una variabilidad mínima de los valores de $CE_{50}$, $CP_{50}$ y $CP_{10}$, es esencial la utilización uniforme de los materiales para el cultivo celular. Los cuatro patrones de referencia en paralelo, que deben incluirse en cada experimento (realizado en las mismas condiciones, incluidos los materiales, el nivel de pases de las células y el personal técnico), pueden garantizar la sensibilidad del ensayo, ya que los valores de $CP_{10}$ de los tres patrones de referencia positivos deben quedar dentro del intervalo aceptable, como también los valores de $CP_{50}$ y de $CE_{50}$, cuando puedan calcularse (véase el cuadro 1).

*Cuadro 1*

**Intervalo aceptable de valores de los cuatro patrones de referencia para el ensayo de agonistas ER**

| Nombre | log $CP_{50}$ | log $CP_{10}$ | log $CE_{50}$ | Pendiente de Hill | Intervalo de ensayo |
|---|---|---|---|---|---|
| 17β-Estradiol (E2) N.º CAS: 50-28-2 | -11,4 ~ -10,1 | < -11 | -11,3 ~ -10,1 | 0,7 ~ 1,5 | $10^{-14}$~$10^{-8}$ M |
| 17α-Estradiol N.º CAS: 57-91-0 | -9,6 ~ -8,1 | -10,7 ~ -9,3 | -9,6 ~ -8,4 | 0,9 ~ 2,0 | $10^{-12}$~$10^{-6}$ M |
| Corticosterona N.º CAS: 50-22-6 | — | — | — | — | $10^{-10}$~$10^{-4}$ M |
| 17α-Metiltestosterona N.º CAS: 58-18-4 | -6,0 ~ -5,1 | -8,0 ~ -6,2 | — | — | $10^{-11}$~$10^{-5}$ M |

*Patrones de referencia positivos y negativos para el ensayo de antagonistas del ER*

15. Antes del estudio y durante el mismo, debe verificarse la sensibilidad del sistema de ensayo utilizando las concentraciones adecuadas de una sustancia positiva (tamoxifeno) y una sustancia negativa (flutamida). En el cuadro 2 figuran los valores del intervalo aceptable derivados del estudio de validación (1). Estos dos patrones de referencia en paralelo deben incluirse en cada experimento y los resultados deben considerarse correctos según se indica en los criterios. En caso contrario, debe determinarse la causa del incumplimiento de los criterios (por ejemplo, manipulación de las células, o calidad y concentración de suero y antibióticos) y repetirse el ensayo. Además, deben calcularse los valores de $CI_{50}$ de una sustancia positiva (tamoxifeno) y los resultados deben quedar dentro de los límites aceptables establecidos. Una vez cumplidos los criterios de aceptabilidad, para garantizar una variabilidad mínima de los valores de $CI_{50}$, es esencial la utilización uniforme de los materiales para el cultivo celular. Los dos patrones de referencia en paralelo, que deben incluirse en cada experimento (realizado en las mismas condiciones, incluidos los materiales, el nivel de pases de las células y el personal técnico), pueden garantizar la sensibilidad del ensayo (véase el cuadro 2).

▼M8

*Cuadro 2*

**Criterios e intervalo aceptable de valores de los dos patrones de referencia para el ensayo de antagonistas del ER.**

| Nombre | Criterios | Log $CI_{50}$ | Intervalo de ensayo |
|---|---|---|---|
| Tamoxifeno N.º CAS: 10540-29-1 | Positivo: debe calcularse la $CI_{50}$. | -5,942 ~ -7,596 | $10^{-10}$ ~ $10^{-5}$ M |
| Flutamida N.º CAS: 13311-84-7 | Negativo: no debe calcularse la $CI_{30}$. | — | $10^{-10}$ ~ $10^{-5}$ M |

*Testigos positivos y control del vehículo*

16. El testigo positivo (TP) del ensayo de agonistas ER (1 nM de E2) y del ensayo de antagonistas ER (10 μM de tamoxifeno) se someterá a ensayo al menos por triplicado en cada placa. El vehículo que se utilice para disolver un producto problema debe someterse a ensayo como control del vehículo (CVe) al menos por triplicado en cada placa. Además de este CVe, si el TP utiliza un vehículo diferente al del producto problema, debe ensayarse otro CVe al menos por triplicado en la misma placa con el TP.

*Criterios de calidad para el ensayo de agonistas ER*

17. La actividad media de la luciferasa del testigo positivo (E2 1 nM) debe ser al menos cuatro veces la media del CVe de cada placa. Este criterio se establece sobre la base de la fiabilidad de los valores de los parámetros obtenidos en el estudio de validación (históricamente, un factor multiplicador de entre cuatro y treinta).

18. Con respecto al control de calidad del ensayo, el factor multiplicador de la inducción correspondiente al valor de $CP_{10}$ del TP en paralelo (E2 1 nM) debe ser superior a 1 + 2 DT del valor del factor multiplicador de la inducción (= 1) del CVe en paralelo. A efectos de priorización, el valor de $CP_{10}$ puede ser útil para simplificar el análisis de datos requerido en comparación con un análisis estadístico. Aunque un análisis estadístico proporciona información sobre la significación, dicho análisis no es un parámetro cuantitativo en relación con el potencial basado en la concentración, por lo que es menos útil a efectos de priorización.

*Criterios de calidad para el ensayo de agonistas del ER*

19. La actividad media de la luciferasa del control con el testigo añadido (solución 25 pM de E2) debe ser al menos cuatro veces la media del CVe de cada placa. Este criterio se establece sobre la base de la fiabilidad de los valores de los parámetros obtenidos en el estudio de validación.

20. Por lo que respecta al control de calidad del ensayo, la actividad transcripcional relativa (ATR) de la solución 1 nM de E2 debe ser superior al 100 %; la ATR de la solución 1 μM de 4-hidroxitamixofeno (OHT) debe ser inferior al 40,6 %, y la ATR de solución 100 μM de digitonina (Dig) debe ser inferior al 0 %.

Demostración de la competencia del laboratorio (véanse el punto 14 y los cuadros 3 y 4 de la sección «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA» del presente método de ensayo)

**Vehículo**

21. Debe utilizarse como CVe en paralelo el dimetilsulfóxido (DMSO), o el disolvente adecuado, a la misma concentración utilizada con los diferentes testigos positivos y negativos y los productos problema. Los productos problema deben disolverse en un disolvente que los solubilice y sea miscible con el medio celular. Son vehículos adecuados el agua, el etanol (pureza del 95 % al 100 %) y el DMSO. Si se utiliza el DMSO, el nivel no debe superar el 0,1 % (v/v). Con cualquier vehículo, debe demostrarse que el volumen máximo utilizado no es citotóxico ni interfiere con el comportamiento del ensayo.

▼M8

**Preparación de los productos problema**

22. En general, los productos problema deben disolverse en DMSO o en otro disolvente adecuado, y diluirse en serie con el mismo disolvente a una proporción común de 1: 10, a fin de preparar soluciones para la dilución con los medios.

**Solubilidad y citotoxicidad: Consideraciones para la determinación del intervalo de dosis**

23. Debe realizarse un ensayo preliminar para determinar el intervalo de concentraciones apropiadas del producto problema, y determinar si el producto problema puede tener dificultades en cuanto a su solubilidad y citotoxicidad. Inicialmente, los productos se someten a ensayo hasta la concentración máxima que suponga el valor más bajo de los siguientes: 1 µl/ml, 1 mg/ml, o 1 mM. Sobre la base del grado de citotoxicidad o falta de solubilidad observados en el ensayo preliminar, en la primera tanda definitiva debe someterse a ensayo el producto en diluciones logarítmicas empezando en la concentración máxima aceptable (p. ej., 1 mM, 100 µM, 10 µM, etc.) y debe anotarse la presencia de turbidez o precipitado o de citotoxicidad. Las concentraciones en la segunda y, si es necesaria, tercera tanda deben ajustarse según convenga para caracterizar mejor la curva concentración-respuesta y evitar concentraciones que resulten que son insolubles o inducen una citotoxicidad excesiva.

24. En el caso de los agonistas y antagonistas ER, la presencia de niveles crecientes de citotoxicidad puede alterar significativamente o eliminar la respuesta sigmoidea típica y debe tenerse en cuenta al interpretar los datos. Se utilizarán métodos de ensayo de citotoxicidad que puedan proporcionar información sobre una viabilidad celular del 80 %, utilizando un ensayo adecuado basado en la experiencia de laboratorio.

25. En caso de que los resultados del ensayo de citotoxicidad muestren que la concentración del producto problema ha reducido el número de células en un 20 % o más, esta concentración debe considerarse citotóxica, y las concentraciones iguales o superiores a la concentración citotóxica deben excluirse de la evaluación.

**Exposición al producto y organización de la placa del ensayo**

26. El procedimiento correspondiente a las diluciones del producto (fases 1 y 2) y a la exposición de las células (fase 3) se puede llevar a cabo del siguiente modo:

Fase 1: Cada producto problema debe diluirse en serie en DMSO, o en otro disolvente adecuado, y añadirse a los pocillos de una placa de microvaloración a fin de alcanzar las concentraciones seriadas finales determinadas por el ensayo preliminar de determinación del intervalo de concentraciones [normalmente en una serie de, por ejemplo, 1 mM , 100 µM, 10 µM, 1µM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 100 pM y 10 pM ($10^{-3}$ - $10^{-11}$ M)] para ensayos por triplicado.

Fase 2: Dilución del producto: diluir en primer lugar 1,5 µl del producto problema en el disolvente en un volumen de 500 µl de medio.

Fase 3: Exposición de las células al producto: añadir 50 µl de dilución en el medio (preparada en la fase 2) a un pocillo de ensayo que contenga $10^4$ células/100 µl/pocillo.

El volumen final recomendado de medio necesario para cada pocillo es de 150 µl. Pueden asignarse las muestras de ensayo y los patrones de referencia como se muestra en el cuadro 3 y en el cuadro 4.

▼M8

*Cuadro 3*

**Ejemplo de asignación de las concentraciones de los patrones de referencia en la placa de ensayo en el ensayo de agonistas ER**

| Fila | 17α-Metiltestosterona | | | Corticosterona | | | 17α-Estradiol | | | E2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | Conc 1 (10 μM) | → | → | 100 μM | → | → | 1 μM | → | → | 10 nM | → | → |
| B | Conc 2 (1 μM) | → | → | 10 μM | → | → | 100 nM | → | → | 1 nM | → | → |
| C | Conc 3 (100 nM) | → | → | 1 μM | → | → | 10 nM | → | → | 100 pM | → | → |
| D | Conc 4 (10 nM) | → | → | 100 nM | → | → | 1 nM | → | → | 10 pM | → | → |
| E | Conc 5 (1 nM) | → | → | 10 nM | → | → | 100 pM | → | → | 1 pM | → | → |
| F | Conc 6 (100 pM) | → | → | 1 nM | → | → | 10 pM | → | → | 0,1 pM | → | → |
| G | Conc 7 (10 pM) | → | → | 100 pM | → | → | 1 pM | → | → | 0,01 pM | → | → |
| H | CVe | → | → | → | → | → | TP | → | → | → | → | → |

CVe: control del vehículo (DMSO al 0,1 %); TP: testigo positivo (E2 1 nM).

27. Los patrones de referencia (E2, 17α-estradiol, Los patrones de referencia (E2, 17α-estradiol, 17 α-metil-testosterona y corticosterona) deben someterse a ensayo en cada tanda (cuadro 3). En cada placa del ensayo (cuadro 4) se deben incluir pocillos de TP tratados con solución 1 nM de E2 que puedan dar como resultado la máxima inducción de E2 y pocillos de CVe tratados únicamente con DMSO (o disolvente apropiado). Si en el mismo experimento se utilizan células procedentes de distintas fuentes (por ejemplo, con diferente número de pases, de un lote diferente, etc.), los patrones de referencia deben someterse a ensayo respecto a cada fuente de las células.

*Cuadro 4*

**Ejemplo de asignación de las concentraciones de los productos problema y de los testigos de las placas en la placa de ensayo de agonistas ER**

| Fila | Producto problema 1 | | | Producto problema 2 | | | Producto problema 3 | | | Producto problema 4 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | Conc 1 (10 μM) | → | → | 1 mM | → | → | 1 μM | → | → | 10 nM | → | → |
| B | Conc 2 (1 μM) | → | → | 100 μM | → | → | 100 nM | → | → | 1 nM | → | → |
| C | Conc 3 (100 nM) | → | → | 10 μM | → | → | 10 nM | → | → | 100 pM | → | → |

▼**M8**

| Fila | Producto problema 1 | | | Producto problema 2 | | | Producto problema 3 | | | Producto problema 4 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| D | Conc 4 (10 nM) | → | → | 1 µM | → | → | 1 nM | → | → | 10 pM | → | → |
| E | Conc 5 (1 nM) | → | → | 100 nM | → | → | 100 pM | → | → | 1 pM | → | → |
| F | Conc 6 (100 pM) | → | → | 10 nM | → | → | 10 pM | → | → | 0,1 pM | → | → |
| G | Conc 7 (10 pM) | → | → | 1 nM | → | → | 1 pM | → | → | 0,01 pM | → | → |
| H | CVe | → | → | → | → | → | TP | → | → | → | → | → |

CVe: control del vehículo (DMSO al 0,1 %); TP: testigo positivo (E2 1 nM).

*Cuadro 5*

**Ejemplo de asignación de las concentraciones de los patrones de referencia en la placa de ensayo en el ensayo de antagonistas ER**

| Fila | Tamoxifeno | | | Flutamida | | | Producto problema 1 | | | Producto problema 2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | Conc 1 (10 µM) | → | → | 10 µM | → | → | 10 µM | → | → | 10 µM | → | → |
| B | Conc 2 (1 µM) | → | → | 1 µM | → | → | 1 µM | → | → | 1 µM | → | → |
| C | Conc 3 (100 nM) | → | → | 100 nM | → | → | 100 nM | → | → | 100 nM | → | → |
| D | Conc 4 (10 nM) | → | → | 10 nM | → | → | 10 nM | → | → | 10 nM | → | → |
| E | Conc 5 (1 nM) | → | → | 1 nM | → | → | 1 nM | → | → | 1 nM | → | → |
| F | Conc 6 (100 pM) | → | → | 100 pM | → | → | 100 pM | → | → | 100 pM | → | → |
| G | DMSO al 0,1 % | → | → | → | → | → | 1 µM OHT | → | → | 100 µM Dig | → | → |
| H | CVe | → | → | → | → | → | TP | → | → | → | → | → |

CVe: control del vehículo (DMSO al 0,1 %); TP: testigo positivo (E2 1 nM), OHT: 4-hidroxitamoxifeno, Dig: digitonina.

= con adición de 25 pM de E2

28. Para evaluar la actividad antagonista de los productos, a los pocillos de ensayo situados en las filas de A a G se les debe añadir solución 25 pM de E2. Los patrones de referencia (tamoxifeno y flutamida) deben someterse a ensayo en cada tanda. En cada placa del ensayo deben incluirse pocillos de TP tratados con solución 1 nM de E2 que pueden servir de control de la calidad de la línea celular hERα-HeLa-9903, pocillos de CVe tratados con DMSO (o disolvente apropiado), pocillos con solución al 0,1 % de DMSO tratados con adición de DMSO al E2 añadido correspondiente al «control con el testigo añadido», pocillos tratados con la concentración final 1 µM de OHT y pocillos tratados con solución 100 µM de Dig (cuadro 5). La placa del ensayo posterior debe seguir la misma disposición de placa sin los pocillos de los patrones de referencia (cuadro 6). Si en el mismo experimento se utilizan células procedentes de distintas fuentes (por ejemplo, con diferente número de pases, de un lote diferente, etc.), los patrones de referencia deben someterse a ensayo respecto a cada fuente de las células.

▼M8

*Cuadro 6*

**Ejemplo de asignación de las concentraciones de los productos problema y de los testigos de las placas del ensayo de antagonistas ER**

| Fila | Producto problema 1 | | | Producto problema 2 | | | Producto problema 3 | | | Producto problema 4 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | Conc 1 (10 µM) | | | 10 µM | | | 10 µM | | | 10 µM | | |
| B | Conc 2 (1 µM) | | | 1 µM | | | 1 µM | | | 1 µM | | |
| C | Conc 3 (100 nM) | | | 100 nM | | | 100 nM | | | 100 nM | | |
| D | Conc 4 (10 nM) | | | 10 nM | | | 10 nM | | | 10 nM | | |
| E | Conc 5 (1 nM) | | | 1 nM | | | 1 nM | | | 1 nM | | |
| F | Conc 6 (100 pM) | | | 100 pM | | | 100 pM | | | 100 pM | | |
| G | DMSO al 0,1 % | | | | | | 1 µM OHT | | | 100 µM Dig | | |
| H | CVe | → | → | → | → | → | TP | → | → | → | → | → |

CVe: control del vehículo (DMSO al 0,1 %); TP: testigo positivo (E2 1 nM), OHT: 4 -hidroxitamoxifeno, Dig: digitonina.

: con adición de solución 25 pM de E2

29. Debe confirmarse la ausencia de efectos de borde, según proceda, y, si se sospecha que hay presencia de estos efectos, debe modificarse la disposición de la placa para evitarlos. Por ejemplo, se puede utilizar una disposición de placa en la que se excluyan los pocillos del borde.

30. Después de añadir los productos, las placas de ensayo deben incubarse en una incubadora con 5 % de $CO_2$ a 37 ± 1°C durante 20-24 horas para inducir la formación de los productos del gen marcador.

31. Deben aplicarse consideraciones especiales a los compuestos que sean ligeramente volátiles. En tales casos, los pocillos testigo cercanos pueden generar falsos positivos, lo que debe tenerse en cuenta a la luz de los valores previstos e históricos de los testigos. En los pocos casos en los que la volatilidad puede ser preocupante, el uso de «selladores de placas» puede ayudar a aislar eficazmente los distintos pocillos durante el ensayo, por lo que se recomienda en tales casos.

32. La repetición de los ensayos definitivos con el mismo producto debe hacerse en días distintos a fin de garantizar su independencia.

**Ensayo de la luciferasa**

33. Para el ensayo puede utilizarse un reactivo comercial del ensayo de la luciferasa [p. ej., el sistema de ensayo de la luciferasa Steady-Glo® (Promega, E2510, o equivalente)] o un sistema de ensayo de la luciferasa normal (p. ej., Promega, E1500, o equivalente), siempre que se cumplan los criterios de aceptabilidad. Los reactivos del ensayo deben seleccionarse sobre la base de la sensibilidad del luminómetro que se vaya a usar. Cuando se utilice el sistema de ensayo de la luciferasa normal, antes de añadir el sustrato se debe utilizar el reactivo de lisis del cultivo celular (p. ej., Promega, E1531, o equivalente). El reactivo de la luciferasa debe aplicarse siguiendo las instrucciones del fabricante.

**ANÁLISIS DE LOS DATOS**

**Ensayo de agonistas ER**

34. En el caso de un ensayo de agonistas ER, para obtener la actividad transcripcional relativa respecto al TP (solución 1 nM de E2), las señales de luminiscencia de la misma placa pueden analizarse con arreglo a las siguientes fases (también son aceptables otros procesos matemáticos equivalentes):

Fase 1. Calcular el valor medio del CVe.

▼M8

Fase 2. Restar el valor medio del CVe del valor de cada pocillo para normalizar los datos.

Fase 3. Calcular la media del TP normalizado.

Fase 4. Dividir el valor normalizado de cada pocillo en la placa por el valor medio del TP normalizado (TP = 100 %).

El valor final de cada pocillo es la actividad transcripcional relativa de ese pocillo en comparación con la respuesta del TP.

Fase 5. Calcular el valor medio de la actividad transcripcional relativa de cada grupo de concentraciones del producto problema. La respuesta tiene dos dimensiones: la media de la actividad transcripcional (respuesta) y la concentración a la que se produce la respuesta (véase la sección siguiente).

**Consideraciones de la inducción respecto a $CE_{50}$, $CP_{50}$ y $CP_{10}$**

35. La curva completa concentración-respuesta es necesaria para el cálculo de la $CE_{50}$, pero puede que esto no sea siempre factible o práctico debido a las limitaciones del intervalo de concentraciones de ensayo (a causa de, por ejemplo, problemas de solubilidad o de citotoxicidad). Sin embargo, dado que la $CE_{50}$ y el nivel de inducción máximo (que corresponde al valor superior de la ecuación de Hill) son parámetros informativos, estos parámetros deben comunicarse cuando sea posible. Para el cálculo de la $CE_{50}$ y del nivel de inducción máximo, deben utilizarse los programas estadísticos adecuados (p. ej., los programas informáticos estadísticos Prism). Si la ecuación logística de Hill es aplicable a los datos de respuesta a la concentración, la $CE_{50}$ debe calcularse con la ecuación siguiente (7):

Y = valor inferior + (valor superior - valor inferior) / {1 + 10 exp [(log $CE_{50}$ - X) x pendiente de Hill]}, donde:

X es el logaritmo de la concentración; e

Y es la respuesta; Y se inicia en el valor inferior y llega al valor superior siguiendo una curva sigmoidea. El valor inferior se fija en cero en la ecuación logística de Hill.

36. Respecto a cada producto problema debe proporcionarse la siguiente información:

la $RCP_{Máx}$, que es el nivel máximo de respuesta inducido por un producto problema, expresado como porcentaje de la respuesta inducida por una solución 1 nM de E2 en la misma placa, así como la $CP_{Máx}$ (concentración asociada a la $RCP_{Máx}$); y

en el caso de productos positivos, las concentraciones que inducen la $CP_{10}$ y, si procede, la $CP_{50}$.

37. El valor de la $CP_x$ puede calcularse interpolando entre dos puntos en las coordenadas X-Y, uno inmediatamente por encima y otro inmediatamente por debajo de un valor de $CP_x$. Si los puntos de datos situados inmediatamente por encima y por debajo del valor de $CP_x$ tienen las coordenadas (a, b) y (c, d) respectivamente, entonces el valor de $CP_x$ podrá calcularse utilizando la siguiente ecuación:

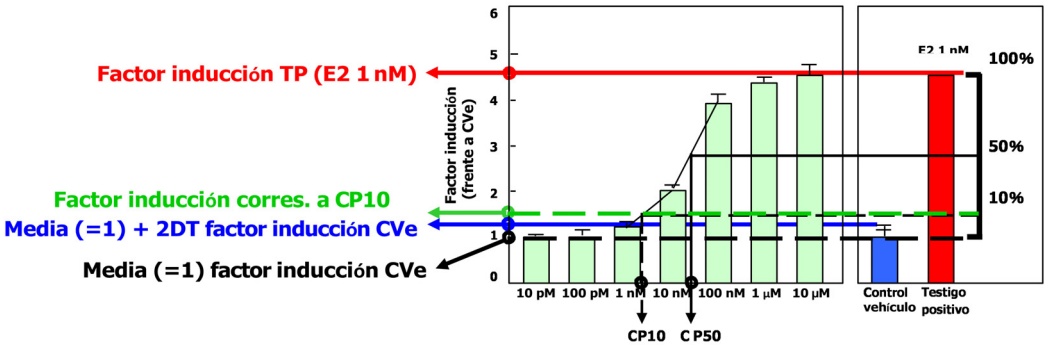
$$\log [CP_x] = \log [c] + (x-d)/(d-b)$$

▼M8

38. En la figura 1 se ofrecen descripciones de los valores de CP.

*Figura 1*

**Ejemplo de cómo calcular los valores de CP. El TP (solución 1 nM de E2) se incluye en cada placa de ensayo.**




**Ensayo de antagonistas ER**

39. En el caso de un ensayo de antagonistas ER, para obtener la actividad transcripcional relativa (ATR) respecto al control con el testigo añadido (solución 25 pM de E2), las señales de luminiscencia de la misma placa pueden analizarse con arreglo a las siguientes fases (también son aceptables otros procesos matemáticos equivalentes):

Fase 1. Calcular el valor medio del CVe.

Fase 2. Restar el valor medio del CVe del valor de cada pocillo para normalizar los datos. Fase 3. Calcular la media del control con el testigo añadido normalizado.

Fase 4. Dividir el valor normalizado de cada pocillo en la placa por el valor medio del "control con el testigo añadido" normalizado (control con el testigo añadido = 100 %).

El valor final de cada pocillo es la actividad transcripcional relativa de ese pocillo en comparación con la respuesta del control con el testigo añadido.

Fase 5. Calcular el valor medio de la actividad transcripcional relativa de cada tratamiento.

**Consideraciones de la inducción respecto a $CI_{30}$ y $CI_{50}$**

40. En el caso de los productos positivos, deben indicarse las concentraciones que inducen la $CI_{30}$ y, si procede, la $CI_{50}$.

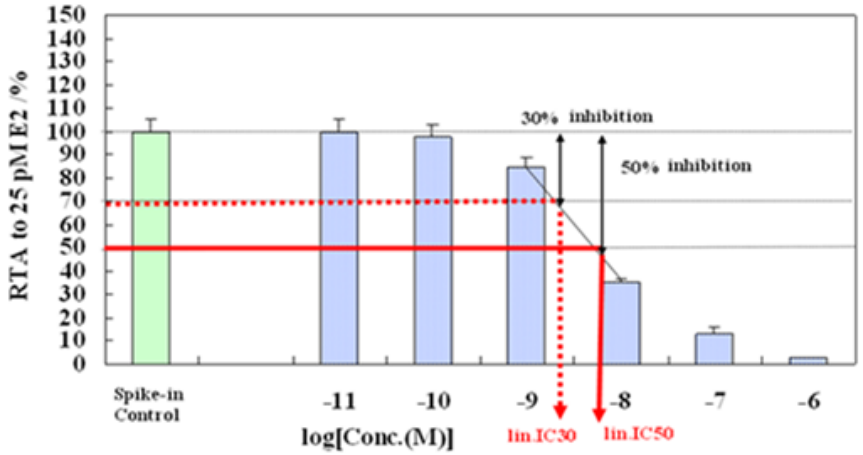
41. El valor de $CI_x$ puede calcularse interpolando entre dos puntos en las coordenadas X-Y, uno inmediatamente por encima y otro inmediatamente por debajo de un valor $CI_x$. Si los puntos de datos situados inmediatamente por encima y por debajo del valor de $CI_x$ tienen las coordenadas (c, d) y (a, b) respectivamente, entonces el valor de $CI_x$ podrá calcularse utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{lin } CI_x = a - (b - (100 - x))\ (a - c)\ /(b - d)$$

▼M8

*Figura 2*

**Ejemplo de cómo calcular los valores de CI. El control con el testigo añadido (solución 25 pM de E2) se incluye en cada placa de ensayo.**




ATR: actividad transcripcional relativa.

42. Los resultados deben basarse en dos (o tres) tandas independientes. Si dos tandas dan resultados comparables y, por lo tanto, reproducibles, no es necesario realizar una tercera tanda. Para ser aceptables, los resultados deben:

— cumplir los criterios de aceptabilidad (véanse los criterios de aceptabilidad, puntos 14-20),

— ser reproducibles.

**Criterios de interpretación de los datos**

*Cuadro 7*

**Criterios de decisión sobre el carácter positivo o negativo en el ensayo de agonistas ER.**

| | |
|---|---|
| Positivo | Si se obtiene una $RCP_{Máx}$ que es igual o superior al 10 % de la respuesta del testigo positivo en al menos dos de dos o dos de tres tandas. |
| Negativo | Si se obtiene una $RCP_{Máx}$ que es inferior al 10 % de la respuesta del testigo positivo en dos de dos o dos de tres tandas. |

*Cuadro 8*

**Criterios de decisión sobre el carácter positivo o negativo en el ensayo de antagonistas ER.**

| | |
|---|---|
| Positivo | Si se calcula la $CI_{30}$ en al menos dos de dos o dos de tres tandas. |
| Negativo | Si no se calcula la $CI_{30}$ en dos de dos o dos de tres tandas. |

▼**M8**

43. Los criterios de interpretación de los datos figuran en los cuadros 7 y 8. Los resultados positivos se caracterizarán tanto por la magnitud del efecto como por la concentración a la que se produce el efecto. Ambos objetivos se alcanzan mediante la expresión de los resultados como la concentración a la que se alcanza un 50 % ($CP_{50}$) o un 10 % ($CP_{10}$) de los valores del TP en el ensayo de agonistas, y el 50 % ($CI_{50}$) o el 30 % ($CI_{30}$) del valor del control con el testigo añadido en el ensayo de antagonistas. Sin embargo, se determina que un producto problema es positivo si la respuesta máxima inducida por el producto problema es igual o superior al 10 % de la respuesta del TP en al menos dos de dos o dos de tres tandas, mientras que un producto problema se considera negativo si la $RCP_{Máx}$ no alcanza al menos el 10 % de la respuesta del testigo positivo en dos de dos o dos de tres tandas.

44. Los cálculos de $CP_{10}$, $CP_{50}$ y $CP_{Máx}$ en el ensayo de agonistas ER, y $CI_{30}$ y $CI_{50}$ en el ensayo de antagonistas ER pueden efectuarse utilizando una hoja de cálculo disponible con las directrices de ensayo en el sitio web público de la OCDE ([1]).

45. Debe ser suficiente con obtener los valores $CP_{10}$ o $CP_{50}$ y $CI_{30}$ o $CI_{50}$ al menos dos veces. Sin embargo, si los valores resultantes de referencia para los datos en el mismo intervalo de concentraciones presenta variabilidad con un coeficiente de variación inaceptablemente elevado (CV; %), los datos no se pueden considerar fiables y debe identificarse la fuente de esa elevada variabilidad. El CV de los datos brutos triplicados (es decir, datos de intensidad de la luminiscencia) de los puntos de datos que se utilizan para el cálculo del valor de $CP_{10}$ debe ser inferior al 20 %.

46. El cumplimiento de los criterios de aceptabilidad indica que el sistema de ensayo funciona correctamente, pero no garantiza que cualquier tanda de ensayo concreta produzca datos exactos. La duplicación de los resultados de la primera tanda es la mejor garantía de que se han producido datos exactos.

47. En el caso de un ensayo de agonistas ER, cuando se requiere más información adicional a los objetivos de cribado y priorización de las presentes TG con respecto a los productos problema positivos, especialmente productos $CP_{10}$ - $CP_{49}$, así como productos sospechosos de sobreestimular la luciferasa; puede confirmarse que la actividad de luciferasa observada es únicamente una respuesta específica del ERα, utilizando un antagonista ERα (véase el apéndice 2.1).

*INFORME DEL ENSAYO*

48. Véase el punto 20 de la sección «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA».

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2015). Report of the Inter-Laboratory Validation for Stably Transfected Transactivation Assay to detect Estrogenic and Anti-estrogenic Activity. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 225), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(2) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(3) Kuiper G.G., *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

([1]) http://www.oecd.org/env/testguidelines

▼**M8**

(4) Spaepen M., *et al.* (1992). Detection of Bacterial and Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Polymerase Chain Reaction, FEMS Microbiol. Lett., 78(1), 89-94.

(5) Kobayashi H., *et al.* (1995). Rapid Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Enzymatic Detection of Polymerase Chain Reaction (PCR) Products, J. Vet. Med. Sci., 57(4), 769- 71.

(6) Dussurget O. and Roulland-Dussoix D. (1994). Rapid, Sensitive PCR-Based Detection of Mycoplasmas in Simulated Samples of Animal Sera, *Appl.* Environ. *Microbiol*., 60(3), 953-9.

(7) De Lean A., Munson P.J. and Rodbard D. (1978). Simultaneous Analysis of Families of Sigmoidal Curves: Application to Bioassay, Radioligand Assay, and Physiological Dose-Response Curves, Am. J. *Physiol*., 235, E97-El02.

▼**M8**

*Apéndice 2.1*

FALSOS POSITIVOS: EVALUACIÓN DE LAS SEÑALES DE LUMINISCENCIA NO MEDIADAS POR EL RECEPTOR

1. Los falsos positivos en el ensayo de agonistas ER pueden generarse debido a la activación del gen de la luciferasa no mediada por el ER, o bien debido a la activación directa del producto génico o a fluorescencia no relacionada. Estos efectos se indican mediante una curva dosis-respuesta incompleta o inusual. Si se sospechan tales efectos, debe examinarse el efecto que tiene sobre la respuesta un antagonista ER [p. ej., 4-hidroxitamoxifeno (OHT) a una concentración no tóxica]. El antagonista puro ICI 182780 puede no ser adecuado para este fin, ya que una concentración suficiente de ICI 182780 puede reducir el valor del CVe, lo que afectará al análisis de los datos.

2. Para garantizar la validez de este enfoque, debe someterse a ensayo lo siguiente en la misma placa:

   — actividad agonista del producto desconocido sin/con solución 10 μM de OHT

   — CVe (por triplicado)

   — OHT (por triplicado)

   — solución 1 nM de E2 (por triplicado) como TP agonista

   — solución 1 nM de E2 + OHT (por triplicado).

**Criterios de interpretación de los datos**

Nota: Todos los pocillos deben tratarse con la misma concentración del vehículo.

— Si la actividad agonista del producto desconocido NO se ve afectada por el tratamiento con antagonista ER, se clasifica como «negativo».

— Si se inhibe completamente la actividad agonista del producto desconocido, deben aplicarse los criterios de decisión.

— Si la actividad agonista a la concentración más baja es igual o superior a la respuesta $CP_{10}$, el producto desconocido se inhibe en una medida igual o superior a la respuesta $CP_{10}$. Se calcula la diferencia en las respuestas entre los pocillos no tratados y los pocillos tratados con el antagonista ER, y esta diferencia debe considerarse como la respuesta verdadera y debe utilizarse en el cálculo de los parámetros adecuados para permitir la adopción de una decisión de clasificación.

**Análisis de los datos**

Comprobar la norma de comportamiento.

Comprobar el CV entre los pocillos tratados en las mismas condiciones.

1. Calcular el valor medio del CVe.

2. Restar la media del CVe de los valores de cada pocillo **no** tratado con OHT.

3. Calcular el valor medio de OHT.

4. Restar la media del CVe de los valores de cada pocillo tratado con OHT.

5. Calcular el valor medio del TP.

6. Calcular la actividad transcripcional relativa de todos los demás pocillos respecto al TP.

▼**M8**

*Apéndice 2.2*

PREPARACIÓN DE SUERO TRATADO CON CARBÓN RECUBIERTO DE DEXTRANO (DCC)

1. El tratamiento de suero con carbón recubierto de dextrano (DCC) es un método general para la eliminación de los compuestos estrogénicos del suero que se añade al medio celular, con el fin de excluir una respuesta sesgada asociada a la presencia residual de estrógenos en el suero. Pueden tratarse mediante este procedimiento 500 ml de suero bovino fetal (FBS).

**Componentes**

2. Se necesitan los siguientes materiales y equipo:

*Materiales*

Carbón activo

Dextrano

Cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$)

Sacarosa

Solución amortiguadora HEPES 1 M (pH 7,4)

Agua ultrapura producida a partir de un sistema de filtro

*Equipo*

Centrífuga general de laboratorio con recipientes de vidrio esterilizados en autoclave (el tamaño debe ajustarse según proceda), que pueda fijar la temperatura a 4 °C

**Procedimiento**

3. Se ajusta el siguiente procedimiento para la utilización de tubos de centrífuga de 50 ml:

[Día-1] Preparar la suspensión de carbón recubierto de dextrano con 1 l de agua ultrapura con $MgCl_2$ 1,5 mM, sacarosa 0,25 M, 2,5 g de carbón vegetal, 0,25 g de dextrano y HEPES 5 mM, y agitar a 4 °C durante la noche.

[Día-2] Poner la suspensión en tubos de centrífuga de 50 ml y centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Retirar el sobrenadante y conservar la mitad del sedimento de carbón vegetal a 4 °C para su uso el día-3. Suspender la otra mitad del carbón vegetal con FBS que se ha descongelado suavemente para evitar la precipitación y se ha inactivado a 56 °C durante 30 minutos; transferir después a un recipiente de vidrio esterilizado en autoclave, como por ejemplo un matraz Erlenmeyer. Agitar suavemente esta suspensión a 4 °C durante la noche.

[Día-3] Poner la suspensión con FBS en tubos de centrífuga de 50 ml y centrifugar a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Recoger el FBS y transferirlo al nuevo sedimento de carbón vegetal preparado y conservado el día-2. Suspender el sedimento de carbón vegetal y agitar suavemente esta suspensión en un recipiente de vidrio esterilizado en autoclave, a una temperatura de 4 °C durante la noche.

[Día-4] Disponer la suspensión para su centrifugación a 10 000 rpm a 4 °C durante 10 minutos y esterilizar el sobrenadante mediante filtración a través de un filtro estéril de 0,2 μm. Este DCC-FBS debe conservarse a -20 °C y se puede utilizar durante un máximo de un año.

▼**M8**

*Apéndice 3*

ENSAYO DE TRANSACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO PARA IDENTIFICAR LOS AGONISTAS Y ANTAGONISTAS DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO CON VM7LUC

CONSIDERACIONES Y LIMITACIONES INICIALES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo utiliza la línea celular VM7Luc4E2 ([1]). Ha sido validado por el Centro Interagencias del Programa Nacional de Toxicología para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativo (National Toxicology Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM), y el Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ICCVAM) (1). Las líneas celulares VM7Luc expresan predominantemente el receptor ERα endógeno y una pequeña cantidad de ERβ endógeno (2) (3) (4).

2. Este ensayo es aplicable a una amplia gama de sustancias, a condición de que puedan disolverse en dimetilsulfóxido (DMSO; n.º CAS 67-68-5), no reaccionen con el DMSO ni con el medio de cultivo celular y no sean citotóxicas a las concentraciones utilizadas en el ensayo. Si el uso de DMSO no es posible, podrá emplearse otro vehículo, como etanol o agua (véase el punto 12). El comportamiento demostrado del ensayo de (ant)agonistas VM7Luc ER TA indica que los datos generados con este ensayo pueden dar información sobre los mecanismos de actuación mediados por el ER y podrían tenerse en cuenta a la hora de asignar prioridad a las sustancias para someterse a ensayos adicionales.

3. Este ensayo está diseñado específicamente para detectar la TA mediada a través del hERα y el hERß midiendo la quimioluminiscencia como parámetro. La utilización de la quimioluminiscencia en bioensayos está extendida porque la luminiscencia presenta una alta relación de señal a fondo. Sin embargo, la actividad de la luciferasa de luciérnaga en ensayos celulares puede confundirse por la presencia de sustancias que inhiben la luciferasa, lo que provoca una inhibición aparente o un aumento de la luminiscencia debido a la estabilización de la proteína. Sin embargo, en algunos ensayos de gen marcador de ER a base de luciferasa se han comunicado señales de luminiscencia no mediadas por el receptor a concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 μM como consecuencia de la sobreactivación del gen marcador de la luciferasa (9) (11). Si bien la curva dosis-respuesta indica que la activación real del sistema ER se produce a concentraciones más bajas, debe examinarse detenidamente la expresión de la luciferasa obtenida a altas concentraciones de fitoestrógenos o de compuestos similares sospechosos de producir una sobreactivación de tipo fitoestrogénico del gen marcador de la luciferasa, en los sistemas de ensayo ER TA transfectados de forma estable (véase el apéndice 2).

4. Las secciones «INTRODUCCIÓN GENERAL» y «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA» deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

([1]) Hasta junio de 2016, esta línea celular se designaba BG1Luc. Las células BG-1 fueron descritas inicialmente por Geisinger *et al*. (1998) (12) y fueron caracterizadas más tarde por investigadores del Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental de EE. UU. (Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS) (13). Hace relativamente poco tiempo, se ha descubierto que existen dos variantes diferentes de las células BG-1 que utilizan los investigadores, la BG-1 Fr y la BG-1 NIEHS. Un análisis en profundidad, con ensayos de ADN, de las dos variantes de las líneas celulares BG-1 llevado a cabo por Li y colaboradores (2014) (14) puso de manifiesto que la BG-1 Fr era única y que la BG-1 NIEHS, es decir, la línea celular original utilizada para elaborar el ensayo, no era la línea celular BG1 de carcinoma de ovario humano, sino que era en su lugar una variante de la línea celular MCF7 del cáncer de mama humano. La línea celular utilizada en el ensayo, anteriormente denominada BG1Luc4E2 (15), se designa ahora como VM7Luc4E2 («V» = variante; «M7» = células MCF7). Asimismo, el ensayo se designa ahora como VM7Luc ER TA. Aunque esto cambia el origen de la línea celular en la que se basa el ensayo, no afecta a los estudios de validación publicados ni a la utilidad y aplicación de este ensayo para detectar productos con efectos estrogénicos/antiestrogénicos.

▼M8

**PRINCIPIO DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)**

5. El ensayo se utiliza para indicar la unión de un ligando al ER, seguida por la translocación del complejo receptor-ligando al núcleo. En el núcleo, el complejo receptor-ligando se une a elementos específicos de respuesta de ADN y transactiva el gen marcador (*luc*), lo que da lugar a la producción de luciferasa y a la consiguiente emisión de luz, que puede cuantificarse utilizando un luminómetro. La actividad de la luciferasa puede evaluarse de forma rápida y poco costosa con varios equipos de pruebas disponibles en el comercio. El VM7Luc ER TA utiliza una línea celular de adenocarcinoma de mama humana sensible al ER, la línea VM7, que se ha transfectado de forma estable con una construcción del marcador *luc* de la luciérnaga bajo el control de cuatro elementos de respuesta estrogénica situados en dirección 5' respecto al promotor vírico del tumor de mama del ratón (MMTV), a fin de detectar sustanciascon actividad agonista o antagonista ER *in vitro*. El promotor MMTV muestra reactividad cruzada solo de pequeña intensidad con otras hormonas esteroideas y no esteroideas (8). Los criterios para la interpretación de los datos se describen con detalle en el punto 41. En síntesis, una respuesta positiva se identifica mediante una curva concentración-respuesta que contiene al menos tres puntos con barras de error no solapadas (media ± DT), así como un cambio en la amplitud [unidad luminosa relativa normalizada (ULR)] de al menos el 20 % del valor máximo del patrón de referencia [17β-estradiol (E2; n.º CAS 50-28-2)] en el caso del ensayo de agonistas, clorhidrato de raloxifeno [Ral; n.º CAS 84449-90 -1]/E2 en el caso del ensayo de antagonistas).

PROCEDIMIENTO

**Línea celular**

6. Debe utilizarse para el ensayo la línea celular VM7Luc4E2, transfectada de forma estable. En la actualidad, solo se puede conseguir la línea celular mediante un acuerdo de licencia técnica en la Universidad de California, Davis, California, EE. UU. ([1]), y en Xenobiotic Detection Systems Inc., Durham, Carolina del Norte, EE. UU. ([2]).

**Estabilidad de la línea celular**

7. Para mantener la estabilidad e integridad de la línea celular, las células deben cultivarse en medio de mantenimiento celular a lo largo de más de un pase a partir del cultivo madre congelado (véase el punto 9). Las células no se deben cultivar a lo largo de más de treinta pases. En el caso de la línea celular VM7Luc4E2, treinta pases serán aproximadamente tres meses.

**Condiciones de cultivo y siembra de las células**

8. Deben seguirse los procedimientos especificados en las Orientaciones sobre buenas prácticas en materia de cultivo de células (5) (6) para garantizar la calidad de todos los materiales y métodos con el fin de mantener la integridad, validez y reproducibilidad de los trabajos realizados.

9. Las células VM7Luc4E2 se mantienen en el medio RPMI 1 640 complementado con 0,9 % de Pen-Strep y 8,0 % de suero bovino fetal (FBS) en una incubadora de cultivos tisulares aparte, a una temperatura de 37ºC ± 1ºC, una humedad del 90 % ± 5 % y un contenido de $CO_2$ en el aire del 5,0 % ± 1 %.

10. Al llegar al ~ 80 % de confluencia, las células VM7Luc4E2 se subcultivan y se ponen en un medio libre de estrógenos durante 48 horas antes de sembrarlas en placas de 96 pocillos para exponerlas a los productos problema y analizar la inducción de la actividad de la luciferasa en función de los estrógenos. El medio libre de estrógenos (EFM) contiene la modificación

([1]) Michael S. Denison, Ph.D. Professor, Dept. of Environmental Toxicology, 4241 Meyer Hall, One Shields Ave, University of California, Davis, CA 95616, correo electrónico:: msdenison@ucdavis.edu, teléfono: (530) 754-8649.

([2]) Xenobiotic Detection Systems Inc. 1601 East Geer Street, Suite S, Durham NC, 27704 USA, correo electrónico: info@dioxins.com, teléfono: 919-688-4804, fax: 919-688-4404.

▼M8

de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM), sin rojo de fenol, complementado con 4,5 % de FBS tratado con carbón/dextrano, 1,9 % de L-glutamina y 0,9 % de Pen-Strep. Todo el material de plástico debe estar libre de actividad estrogénica [véase el protocolo detallado (7)].

**Criterios de aceptabilidad**

11. La aceptación o el rechazo de un ensayo se basa en la evaluación de los resultados obtenidos con los patrones de referencia y los testigos en cada experimento realizado con una placa de 96 pocillos. Cada patrón de referencia se somete a ensayo a diversas concentraciones y hay varias muestras de cada concentración de patrón de referencia yde testigo. Se comparan los resultados con los controles de calidad en relación con estos parámetros derivados de las bases de datos históricos de agonistas y de antagonistas generadas por cada laboratorio durante la demostración de la competencia. Las bases de datos históricos se actualizan continuamente con valores de los patrones de referencia y de los testigos. Los cambios en el equipo o en las condiciones de laboratorio pueden requerir la actualización de las bases de datos históricos.

*Ensayo de agonistas*

Ensayo de determinación del intervalo

- Inducción: La inducción en la placa se mide dividiendo el valor medio más alto de unidades luminosas relativas (ULR) del patrón de referencia E2 por el valor medio de ULR del testigo de DMSO. Se alcanza por lo general un factor de inducción de cinco pero, a efectos de aceptación, dicho factor de inducción debe ser superior o igual a cuatro.

- Resultados del control de DMSO: Los valores de ULR del control del disolvente deben situarse en el intervalo de 2,5 veces la desviación típica respecto al valor medio histórico de ULR del control del disolvente.

- Se debe descartar y repetir todo experimento que incumpla cualquiera de estos criterios de aceptación.

Ensayo completo

Incluye los criterios de aceptabilidad del ensayo de determinación del intervalo de agonistas y los siguientes:

- Resultados con el patrón de referencia: La curva concentración-respuesta del patrón de referencia E2 debe ser de forma sigmoidea y tener al menos tres valores dentro de la porción lineal de la curva concentración-respuesta.

- Resultados del testigo positivo: Los valores de ULR del testigo de metoxicloro deben ser mayores que la media obtenida con el DMSO más el triple de la desviación típica respecto a dicha media.

- Se debe descartar y repetir todo experimento que incumpla cualquiera de estos criterios de aceptación.

*Ensayo de antagonistas*

Ensayo de determinación del intervalo

- Reducción: La reducción en la placa se mide dividiendo el valor medio más alto de ULR del patrón de referencia Ral/E2 por el valor medio de ULR del testigo de DMSO. Se alcanza por lo general un factor de reducción de cinco pero, a efectos de aceptación, dicho factor de reducción debe ser superior o igual a tres.

- Resultados del testigo E2: Los valores de ULR del testigo de E2 deben situarse en el intervalo de 2,5 veces la desviación típica respecto al valor medio histórico de ULR del testigo de E2.

▼M8

- Resultados del control de DMSO: Los valores de ULR del control de DMSO deben situarse en el intervalo de 2,5 veces la desviación típica respecto al valor medio histórico de ULR del control del disolvente.

- Se debe descartar y repetir todo experimento que incumpla cualquiera de estos criterios de aceptación.

Ensayo completo

Incluye los criterios de aceptación del ensayo de determinación del intervalo de antagonistas y los siguientes:

- Resultados con el patrón de referencia: La curva concentración-respuesta del patrón de referencia Ral/E2 debe ser de forma sigmoidea y tener al menos tres valores dentro de la porción lineal de la curva concentración-respuesta.

- Resultados del testigo positivo: Los valores de ULR del testigo de tamoxifeno/E2 deben ser menores que la media obtenida con el testigo de E2 menos el triple de la desviación típica respecto a dicha media.

- Se debe descartar y repetir todo experimento que incumpla cualquiera de estos criterios de aceptación.

**Patrones de referencia, testigos positivos y controles de los vehículos**

*Control de los vehículos (ensayo de agonistas y antagonistas)*

12. El vehículo que se utilice para disolver los productos problema debe someterse a ensayo como control del vehículo. El vehículo utilizado durante la validación del ensayo VM7Luc ER TA fue la solución al 1 % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO, n.º CAS 67-68-5) (véase el punto 24). Si se utiliza un vehículo distinto del DMSO, todos los patrones de referencia, testigos y productos problema deben ensayarse en el mismo vehículo, si procede.

*Patrón de referencia (determinación del intervalo de agonistas)*

13. El patrón de referencia es el E2 (n.º CAS 50-28-2). Para los ensayos de determinación del intervalo, el patrón de referencia consiste en una serie de diluciones de cuatro concentraciones de E2 ($1{,}84 \times 10^{-10}$, $4{,}59 \times 10^{-11}$, $1{,}15 \times 10^{-11}$ y $2{,}87 \times 10^{-12}$ M) y cada concentración se somete al ensayo en pocillos duplicados.

*Patrón de referencia (ensayo completo de agonistas)*

14. El E2 para el ensayo completo consiste en una serie de diluciones 1: 2, compuesta por once concentraciones (desde $3{,}67 \times 10^{-10}$ hasta $3{,}59 \times 10^{-13}$ M) de E2 en pocillos duplicados.

*Patrón de referencia (determinación del intervalo de antagonistas)*

15. El patrón de referencia es una combinación de Ral (n.º CAS 84449-90-1) y E2 (n.º CAS 50-28-2). El Ral/E2 para los ensayos de determinación del intervalo consiste en una serie de diluciones de tres concentraciones de Ral ($3{,}06 \times 10^{-9}$, $7{,}67 \times 10^{-10}$, y $1{,}92 \times 10^{-10}$ M) más una concentración fija ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) de E2 en pocillos duplicados.

*Patrón de referencia (ensayo completo de antagonistas)*

16. El Ral/E2 para los ensayos completos consiste en una serie de diluciones 1: 2 de Ral (desde $2{,}45 \times 10^{-8}$ hasta $9{,}57 \times 10^{-11}$ M) más una concentración fija ($9{,}18 \times 10^{-11}$ M) de E2, dando nueve concentraciones de Ral/E2 que se someten al ensayo en pocillos duplicados.

*Testigo positivo débil (agonistas):*

17. El testigo positivo débil es una disolución $9{,}06 \times 10^{-6}$ M de *p,p'*-metoxicloro (metoxicloro; n.º CAS 72-43-5) en EFM.

▼**M8**

*Testigo positivo débil (antagonistas):*

18. El control positivo débil consiste en una disolución de tamoxifeno (n.º CAS 10540-29-1) 3,36 x $10^{-6}$ M con E2 9,18 × $10^{-11}$ M en EFM.

*Testigo de E2 (ensayo de antagonistas solo)*

19. El testigo de E2 consiste en una solución de E2 9,18 × $10^{-11}$ M en EFM y se utiliza como testigo negativo de referencia.

*Factor de inducción (agonistas)*

20. La inducción de la actividad de luciferasa del patrón de referencia (E2) se mide dividiendo el valor medio más alto de ULR del patrón de referencia E2 por el valor medio de ULR del control de DMSO, y el resultado debe ser mayor que cuatro.

*Factor de reducción (antagonistas)*

21. La actividad media de luciferasa del patrón de referencia (Ral/E2) se mide dividiendo el valor medio más alto de ULR del patrón de referencia Ral/E2 por el valor medio de ULR del control de DMSO, y el resultado debe ser mayor que tres.

*Demostración de la competencia del laboratorio* (véanse el punto 14 y los cuadros 3 y 4 de la sección «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA» del presente método de ensayo)

**Vehículo**

22. Los productos problema deben disolverse en un disolvente que solubilice el producto problema y sea miscible con el medio celular. Son vehículos adecuados el agua, el etanol (pureza del 95 % al 100 %) y el DMSO. Si se utiliza el DMSO, el nivel no debe superar el 1 % (v/v). Con cualquier vehículo, debe demostrarse que el volumen máximo utilizado no es citotóxico ni interfiere con el comportamiento del ensayo. Los patrones de referencia y los testigos se disuelven en disolvente del 100 % y, a continuación, se diluyen hasta las concentraciones adecuadas en EFM.

**Preparación de los productos problema**

23. Los productos problema se disuelven en DMSO (o el disolvente adecuado) del 100 % y, a continuación, se diluyen hasta las concentraciones adecuadas en EFM. Debe dejarse que todos los productos problema se estabilicen a temperatura ambiente antes de disolverse y diluirse. Las soluciones de los productos problema deben prepararse de nuevo para cada experimento. Las soluciones no deben presentar ningún precipitado ni turbidez apreciables. Las soluciones madre de los patrones de referencia y de los testigos pueden prepararse en gran cantidad; sin embargo, las diluciones finales de los patrones de referencia y de los testigos, así como los productos problema deben prepararse de nuevo para cada experimento y utilizarse en las 24 horas siguientes a la preparación.

**Solubilidad y citotoxicidad: consideraciones para la determinación del intervalo de las dosis**

24. El ensayo de determinación del intervalo de las dosis consiste en una tanda con siete diluciones en serie 1: 10 por duplicado. Al principio, los productos problema se ensayan hasta la concentración máxima de 1 mg/ml (~ 1 mM) en las pruebas de agonistas y de 20 μg/ml (~ 10 μM) en las pruebas de antagonistas. Los experimentos de determinación del intervalo de las dosis se utilizan para determinar lo siguiente:

— Concentraciones iniciales del producto problema que deben utilizarse durante los ensayos completos,

— Diluciones del producto problema (1: 2 or 1: 5) que deben utilizarse durante los ensayos completos.

▼M8

25. En los protocolos de ensayo de agonistas y antagonistas (7) se incluye una evaluación de la viabilidad celular / citotoxicidad, que se incorpora en los ensayos de determinación del intervalo y en los ensayos completos. El método de citotoxicidad que se utilizó para evaluar la viabilidad celular durante la validación del VM7Luc ER TA (1) era un método de observación visual cualitativa en una serie graduada; sin embargo, puede utilizarse un método cuantitativo para la determinación de la citotoxicidad [véase el protocolo (7)]. No pueden utilizarse los datos de las concentraciones de producto problema que provoquen una reducción de la viabilidad superior al 20 %.

**Exposición al producto problema y organización de la placa del ensayo**

26. Se hace el recuento de las células y se siembran en placas de cultivo tisular de 96 pocillos (2 x $10^5$ células por pocillo) en EFM y se incuban durante 24 horas para que las células puedan adherirse a la placa. Se retira el EFM; se ponen en su lugar los productos problema y de referencia en EFM, y se incuban durante 19-24 horas. Se debe prestar especial atención a las sustancias que son muy volátiles, ya que la proximidad de los pocillos de los testigos puede generar falsos resultados positivos. En tales casos, el uso de «selladores de placas» puede ayudar a aislar eficazmente los distintos pocillos durante el ensayo, por lo que resulta recomendable.

*Ensayos de determinación del intervalo*

27. Los ensayos de determinación del intervalo utilizan todos los pocillos de la placa de 96 pocillos para estudiar hasta seis productos problema, en una serie de siete diluciones 1: 10 por duplicado (véanse las figuras 1 y 2).

— Las pruebas de determinación del intervalo de *agonistas* utiliza cuatro concentraciones de E2 por duplicado como patrón de referencia y cuatro pocillos replicados para el control de DMSO.

— Las pruebas de determinación del intervalo de *antagonistas* utiliza tres concentraciones de Ral/E2 con una concentración 9,18 × $10^{-11}$ M de E2 por duplicado como patrón de referencia, y tres pocillos replicados para el testigo de E2 y el control de DMSO.

*Figura 1*

**Disposición de las placas de 96 pocillos para el ensayo de determinación del intervalo de agonistas**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | TC1-1 | TC1-1 | TC2-1 | TC2-1 | TC3-1 | TC3-1 | TC4-1 | TC4-1 | TC5-1 | TC5-1 | TC6-1 | TC6-1 |
| **B** | TC1-2 | TC1-2 | TC2-2 | TC2-2 | TC3-2 | TC3-2 | TC4-2 | TC4-2 | TC5-2 | TC5-2 | TC6-2 | TC6-2 |
| **C** | TC1-3 | TC1-3 | TC2-3 | TC2-3 | TC3-3 | TC3-3 | TC4-3 | TC4-3 | TC5-3 | TC5-3 | TC6-3 | TC6-3 |
| **D** | TC1-4 | TC1-4 | TC2-4 | TC2-4 | TC3-4 | TC3-4 | TC4-4 | TC4-4 | TC5-4 | TC5-4 | TC6-4 | TC6-4 |
| **E** | TC1-5 | TC1-5 | TC2-5 | TC2-5 | TC3-5 | TC3-5 | TC4-5 | TC4-5 | TC5-5 | TC5-5 | TC6-5 | TC6-5 |
| **F** | TC1-6 | TC1-6 | TC2-6 | TC2-6 | TC3-6 | TC3-6 | TC4-6 | TC4-6 | TC5-6 | TC5-6 | TC6-6 | TC6-6 |
| **G** | TC1-7 | TC1-7 | TC2-7 | TC2-7 | TC3-7 | TC3-7 | TC4-7 | TC4-7 | TC5-7 | TC5-7 | TC6-7 | TC6-7 |
| **H** | E2-1 | E2-2 | E2-3 | E2-4 | CVe | CVe | CVe | CVe | E2-1 | E2-2 | E2-3 | E2-4 |

Abreviaturas: E2-1 a E2-4 = concentraciones del patrón de referencia E2 (de altas a bajas); TC1-1 a TC1-7 = concentraciones del producto problema 1 (TC1) (de altas a bajas); TC2-1 a TC2-7 = concentraciones del producto problema 2 (TC2) (de altas a bajas); TC3-1 a TC3-7 = concentraciones del producto problema 3 (TC3) (de altas a bajas); TC4-1 a TC4-7 = concentraciones del producto problema 4 (TC4) (de altas a bajas); TC5-1 a TC5-7 = concentraciones del producto problema 5 (TC5) (de altas a bajas); TC6-1 a TC6-7 = concentraciones del producto problema 6 (TC6) (de altas a bajas); CVe = control del vehículo [DMSO (1 % v/v en EFM)].

▼M8

*Figura 2*

**Disposición de las placas de 96 pocillos para el ensayo de determinación del intervalo de antagonistas**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | TC1-1 | TC1-1 | TC2-1 | TC2-1 | TC3-1 | TC3-1 | TC4-1 | TC4-1 | TC5-1 | TC5-1 | TC6-1 | TC6-1 |
| **B** | TC1-2 | TC1-2 | TC2-2 | TC2-2 | TC3-2 | TC3-2 | TC4-2 | TC4-2 | TC5-2 | TC5-2 | TC6-2 | TC6-2 |
| **C** | TC1-3 | TC1-3 | TC2-3 | TC2-3 | TC3-3 | TC3-3 | TC4-3 | TC4-3 | TC5-3 | TC5-3 | TC6-3 | TC6-3 |
| **D** | TC1-4 | TC1-4 | TC2-4 | TC2-4 | TC3-4 | TC3-4 | TC4-4 | TC4-4 | TC5-4 | TC5-4 | TC6-4 | TC6-4 |
| **E** | TC1-5 | TC1-5 | TC2-5 | TC2-5 | TC3-5 | TC3-5 | TC4-5 | TC4-5 | TC5-5 | TC5-5 | TC6-5 | TC6-5 |
| **F** | TC1-6 | TC1-6 | TC2-6 | TC2-6 | TC3-6 | TC3-6 | TC4-6 | TC4-6 | TC5-6 | TC5-6 | TC6-6 | TC6-6 |
| **G** | TC1-7 | TC1-7 | TC2-7 | TC2-7 | TC3-7 | TC3-7 | TC4-7 | TC4-7 | TC5-7 | TC5-7 | TC6-7 | TC6-7 |
| **H** | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | CVe | CVe | CVe | E2 | E2 | E2 | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 |

Abreviaturas: E2 = testigo E2; Ral-1 a Ral-3 = concentraciones del patrón de referencia raloxifeno/E2 (de altas a bajas); TC1-1 a TC1-7 = concentraciones del producto problema 1 (TC1) (de altas a bajas); TC2-1 a TC2-7 = concentraciones del producto problema 2 (TC2) (de altas a bajas); TC3-1 a TC3-7 = concentraciones del producto problema 3 (TC3) (de altas a bajas); TC4-1 a TC4-7 = concentraciones del producto problema 4 (TC4) (de altas a bajas); TC5-1 a TC5-7 = concentraciones del producto problema 5 (TC5) (de altas a bajas); TC6-1 a TC6-7 = concentraciones del producto problema 6 (TC6) (de altas a bajas); CVe = control del vehículo (DMSO [1 % v/v en EFM]).

Nota: Todos los productos problema se someten a ensayo en presencia de E2 a la concentración de $9{,}18 \times 10^{-11}$ M.

28. El volumen final recomendado de medio necesario para cada pocillo es de 200 µl. Deben utilizarse únicamente placas de ensayo en las que las células de todos los pocillos tengan una viabilidad igual o superior al 80 %.

29. En el protocolo de agonistas (7) se describe la determinación de las concentraciones iniciales de los ensayos completos de ***agonistas***. En resumen, se utilizan los siguientes criterios:

— Si en la curva de concentración del producto problema no hay puntos que sean superiores a la media más tres veces la desviación típica del control de DMSO, se realizará un ensayo completo utilizando una dilución en serie 1: 2 con once puntos empezando a la concentración soluble máxima.

— Si en la curva de concentración del producto problema hay puntos que sean superiores a la media más tres veces la desviación típica del control de DMSO, la concentración inicial que se utilizará para la serie de diluciones con once puntos en el ensayo completo debe ser una unidad logarítmica superior a la concentración que dé el mayor valor de ULR ajustado en la determinación del intervalo. La serie de diluciones con once puntos se debe basar en la relación 1: 2 o 1: 5, con arreglo a los criterios siguientes:

Se debe utilizar una serie de diluciones con once puntos en la relación 1: 2 en caso de que el intervalo de concentraciones resultante abarque toda la gama de respuestas según la curva concentración-respuesta generada en el ensayo de determinación del intervalo. En caso contrario, debe utilizarse una relación de dilución de 1: 5.

▼M8

— Si un producto problema presenta una curva de respuesta bifásica en el ensayo de determinación del intervalo, ambas fases deben también incluirse en el ensayo completo.

30. En el protocolo de antagonistas (7) se describe la determinación de las concentraciones iniciales de los ensayos completos de ***antagonistas***. En resumen, se utilizan los siguientes criterios:

— Si en la curva de concentración del producto problema no hay puntos que sean inferiores a la media menos tres veces la desviación típica del testigo de E2, se realizará un ensayo completo utilizando una serie de diluciones con once puntos en la relación 1: 2 empezando a la concentración soluble máxima.

— Si en la curva de concentración del producto problema hay puntos que sean inferiores a la media menos tres veces la desviación típica del testigo de E2, la concentración inicial que se utilizará para la serie de diluciones con once puntos en el ensayo completo debe ser una de las siguientes:

• la concentración que proporciona el valor de ULR ajustado más bajo en el ensayo de determinación del intervalo,

• la concentración soluble máxima [véase el protocolo de antagonistas (7), figura 14-2],

• la concentración citotóxica mínima [véase un ejemplo relacionado en el protocolo de antagonistas (7), figura 14-3].

— La serie de once diluciones se debe basar en la relación 1: 2 o 1: 5, con arreglo a los criterios siguientes:

Se debe utilizar una serie de diluciones con once puntos en la relación 1: 2 en caso de que el intervalo de concentraciones resultante abarque toda la gama de respuestas según la curva concentración-respuesta generada en el ensayo de determinación del intervalo. En caso contrario, debe utilizarse una relación de dilución de 1: 5.

*Ensayos completos*

31. El ensayo completo se compone de una serie de once diluciones (en la relación 1: 2 o 1: 5 diluciones a partir de la concentración inicial según los criterios de ensayo completo), y cada concentración se somete a ensayo en pocillos triplicados de la placa de 96 pocillos (véanse las figuras 3 y 4).

— El ensayo completo de *agonistas* utiliza once concentraciones de E2 por duplicado como patrón de referencia. Se incluyen en cada placa cuatro pocillos replicados del control de DMSO y cuatro pocillos replicados del control de metoxicloro (a la concentración de $9{,}06 \times 10^{-6}$ M).

— El ensayo completo de *antagonistas* utiliza nueve concentraciones de Ral/E2 con una concentración de $E_2$ de $9{,}18 \times 10^{-11}$ M por duplicado como patrón de referencia, con cuatro pocillos replicados para el testigo E2 a la concentración de $9{,}18 \times 10^{-11}$ M, cuatro pocillos replicados para los controles de DMSO, y cuatro pocillos replicados para el tamoxifeno a la concentración de $3{,}36 \times 10^{-6}$ M.

▼M8

*Figura 3*

**Disposición de las placas de 96 pocillos para el ensayo completo de agonistas**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | CVe |
| **B** | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | CVe |
| **C** | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | CVe |
| **D** | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | CVe |
| **E** | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Met |
| **F** | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Met |
| **G** | E2-1 | E2-2 | E2-3 | E2-4 | E2-5 | E2-6 | E2-7 | E2-8 | E2-9 | E2-10 | E2-11 | Met |
| **H** | E2-1 | E2-2 | E2-3 | E2-4 | E2-5 | E2-6 | E2-7 | E2-8 | E2-9 | E2-10 | E2-11 | Met |

Abreviaturas: TC1-1 a TC1-11 = concentraciones del producto problema 1 (de altas a bajas); TC2-1 a TC2-11 = concentraciones del producto problema 2 (de altas a bajas); E2-1 a E2-11 = concentraciones del patrón de referencia E2 (de altas a bajas); Met = *p,p'*-metoxicloro, testigo positivo débil; CVe = disolución de DMSO en EFM al 1 % v/v, control del vehículo

*Figura 4*

**Disposición de las placas de 96 pocillos para el ensayo completo de antagonistas**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A** | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | CVe |
| **B** | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | CVe |
| **C** | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TC1-9 | TC1-10 | TC1-11 | CVe |
| **D** | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | CVe |
| **E** | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Tam |
| **F** | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | TC2-9 | TC2-10 | TC2-11 | Tam |
| **G** | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | Ral-4 | Ral-5 | Ral-6 | Ral-7 | Ral-8 | Ral-9 | E2 | E2 | Tam |
| **H** | Ral-1 | Ral-2 | Ral-3 | Ral-4 | Ral-5 | Ral-6 | Ral-7 | Ral-8 | Ral-9 | E2 | E2 | Tam |

Abreviaturas: E2 = testigo E2; Ral-1 a Ral-9 = concentraciones del patrón de referencia raloxifeno/E2 (de altas a bajas); Tam = tamoxifeno/E2, control positivo débil; TC1-1 a TC1-11 = concentraciones del producto problema 1 (TC1) (de altas a bajas); TC2-1 a TC2-11 = concentraciones del producto problema 2 (TC2) (de altas a bajas); CVe = control del vehículo (DMSO [1 % v/v en EFM]).

Nota: Como se indica, todos los pocillos de referencia y de ensayo contienen una concentración fija de E2 ($9{,}18 \times 10^{-11}$M).

32. La repetición de los ensayos completos con el mismo producto debe hacerse en días distintos, a fin de garantizar su independencia. Deben realizarse al menos dos ensayos completos. Si los resultados de los ensayos se contradicen (por ejemplo, un ensayo es positivo y el otro negativo), o si uno de ellos es inadecuado, se realizará un tercer ensayo adicional.

**Medición de la luminiscencia**

33. Se mide la luminiscencia en el intervalo de 300 a 650 nm, utilizando un luminómetro de inyección y programas informáticos que controlen el volumen de inyección y el intervalo de medición (7). La emisión de luz de cada pocillo se expresa como ULR por pocillo.

▼M8

ANÁLISIS DE LOS DATOS

**Determinación de la $CE_{50}$/$CI_{50}$**

34. El valor de la $CE_{50}$ [concentración de producto problema que produce la mitad del efecto máximo (agonistas)] y el valor de la $CI_{50}$ [concentración del producto problema que produce la mitad de la inhibición máxima (antagonistas)] se determinan a partir de los datos de concentración-respuesta. En el caso de productos problema que sean positivos a una o más concentraciones, la concentración del producto problema que causa la mitad de la respuesta máxima ($CI_{50}$ o $CE_{50}$) se calcula utilizando un análisis de función de Hill o una alternativa adecuada. La función de Hill consiste en un modelo matemático logístico de cuatro parámetros que relaciona la concentración del producto problema con la respuesta (por lo general, según una curva sigmoidea) utilizando la siguiente ecuación:

$$Y = Valor\ inferior + \frac{(Valor\ superior - Valor\ inferior)}{1 + 10(lgEC_{50} - X)Pendiente\ de\ Hill}$$

donde:

Y = respuesta (es decir, ULR);

X = logaritmo de la concentración;

Valor inferior = respuesta mínima;

Valor superior = respuesta máxima;

lg $CE_{50}$ (o lg $CI_{50}$ = logaritmo de X como respuesta intermedia entre el valor superior y el valor inferior;

Pendiente de Hill = pendiente de la curva.

El modelo calcula el mejor ajuste de los parámetros valor superior, valor inferior, pendiente de Hill, y $CI_{50}$ y $CE_{50}$. Para el cálculo de los valores $CI_{50}$ y $CE_{50}$, deben utilizarse programas informáticos estadísticos adecuados (por ejemplo, los de Graphpad Prism$^{R}$).

**Determinación de los valores atípicos**

35. Podría facilitarse un buen juicio estadístico si se incluyera el test Q (pero sin limitarse a este) [véanse los protocolos de agonistas y de antagonistas (7) para determinar los pocillos «inutilizables» que se excluirán del análisis de los datos].

36. En el caso de las réplicas del patrón de referencia E2 (tamaño de la muestra de dos), se considerará que un valor de ULR ajustado correspondiente a una réplica a una concentración dada de E2 es atípico si su valor es superior o inferior en más del 20 % al valor de ULR ajustado a esa concentración en la base de datos históricos.

**Recogida y ajuste de los datos del luminómetro correspondientes al ensayo de determinación del intervalo**

37. Los datos brutos del luminómetro deben transferirse a una hoja de cálculo diseñada para el ensayo. Debe determinarse si hay puntos de datos atípicos que hayan de eliminarse. (Véanse los criterios de aceptación del ensayo en relación con los parámetros que se determinan en los análisis). Deben llevarse a cabo los siguientes cálculos:

*Agonista*

Fase 1 Calcular el valor medio del control del vehículo de DMSO (CVe).

Fase 2 Restar el valor medio del CVe de DMSO del valor de cada pocillo para normalizar los datos.

▼**M8**

Fase 3 Calcular el factor medio de inducción del patrón de referencia (E2).

Fase 4 Calcular el valor medio de $CE_{50}$ de los productos problema.

*Antagonista*

Fase 1 Calcular el valor medio del CVe de DMSO.

Fase 2 Restar el valor medio del CVe de DMSO del valor de cada pocillo para normalizar los datos.

Fase 3 Calcular el factor medio de reducción del patrón de referencia (Ral/E2).

Fase 4 Calcular el valor medio del patrón de referencia E2.

Fase 5 Calcular el valor medio de $CI_{50}$ de los productos problema.

**Recogida y ajuste de los datos del luminómetro correspondientes al ensayo completo**

38. Los datos brutos del luminómetro deben transferirse a una hoja de cálculo diseñada para el ensayo. Debe determinarse si hay puntos de datos atípicos que hayan de eliminarse. (Véanse los criterios de aceptación del ensayo en relación con los parámetros que se determinan en los análisis). Deben llevarse a cabo los siguientes cálculos:

*Agonista*

Fase 1 Calcular el valor medio del CVe de DMSO.

Fase 2 Restar el valor medio del CVe de DMSO del valor de cada pocillo para normalizar los datos.

Fase 3 Calcular el factor medio de inducción del patrón de referencia (E2).

Fase 4 Calcular el valor medio de $CE_{50}$ de E2 y los productos problema.

Fase 5 Calcular el valor de ULR medio ajustado del metoxicloro.

*Antagonista*

Fase 1 Calcular el valor medio del CVe de DMSO.

Fase 2 Restar el valor medio del CVe de DMSO del valor de cada pocillo para normalizar los datos.

Fase 3 Calcular el factor medio de inducción del patrón de referencia (Ral/E2).

Fase 4 Calcular el valor medio de $CI_{50}$ de Ral/E2 y los productos problema.

Fase 5 Calcular el valor de ULR medio ajustado del tamoxifeno.

Fase 6 Calcular el valor medio del patrón de referencia E2.

▼M8

**Criterios de interpretación de los datos**

39. El VM7Luc TE TA se entiende como parte de un enfoque de ponderación de las pruebas para ayudar a asignar prioridades a las sustancias para el ensayo de la alteración endocrina *in vivo*. Parte de este procedimiento de asignación de prioridades será la clasificación del producto problema como positivo o negativo en cuanto a la actividad como agonista o antagonista del ER. Los criterios de decisión como producto positivo o negativo utilizados en el estudio de validación VM7Luc ER TA se describen en el cuadro 1.

*Cuadro 1*

**Criterios de decisión como producto positivo o negativo**

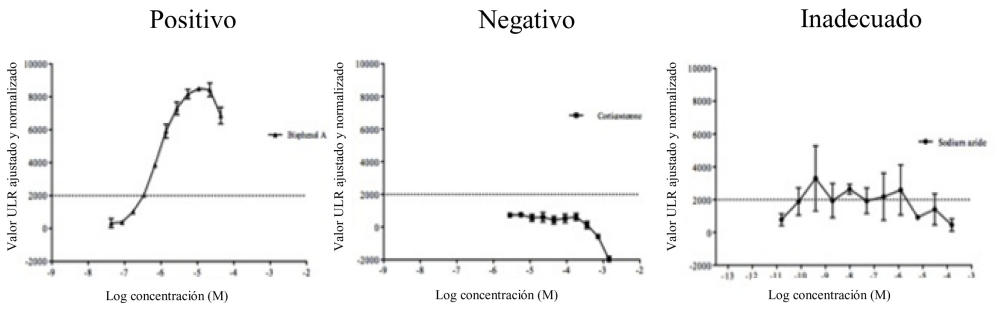
| | |
|---|---|
| ACTIVIDAD COMO AGONISTA | |
| Positivo | — Todos los productos problema clasificados como *positivos* en cuanto a la actividad como agonista del ER deben presentar una curva concentración-respuesta que consista en una línea de base, seguida de una pendiente positiva, y que se concluya en una meseta o pico. En algunos casos, pueden estar definidas solo dos de estas características (línea de base - pendiente, o pendiente - pico).<br>— La línea que define la pendiente positiva debe contener al menos tres puntos con barras de error no solapadas (media ± DT). Se excluyen los puntos que forman la línea de base, pero la parte lineal de la curva puede incluir el pico o el primer punto de la meseta.<br>— Una clasificación como producto positivo requiere una amplitud de respuesta (la diferencia entre la línea de base y el pico) de al menos el 20 % del valor máximo del patrón de referencia, E2 [es decir, 2 000 ULR o más cuando el valor de la respuesta máxima del patrón de referencia (E2) se ajusta a 10 000 ULR].<br>— Si es posible, deberá calcularse un valor de la $CE_{50}$ para cada producto problema positivo. |
| Negativo | El valor de ULR ajustado medio para una concentración dada es igual o inferior a valor de ULR medio del control de DMSO más el triple de la desviación típica del valor de ULR del DMSO. |
| Inadecuado | Se considera que los datos que no pueden interpretarse como válidos para demostrar la presencia o la ausencia de actividad por limitaciones cualitativas o cuantitativas importantes son inadecuados y no pueden utilizarse para determinar si el producto problema es positivo o negativo. Los productos deben someterse a ensayo de nuevo. |
| ACTIVIDAD COMO ANTAGONISTA | |
| Positivo | — Los datos del producto problema producen una curva concentración-respuesta que consiste en una línea de base, a la que sigue una pendiente negativa.<br>— La línea que define la pendiente negativa debe contener al menos tres puntos con barras de error no solapadas; se excluyen los puntos que forman la línea de base, pero la parte lineal de la curva puede incluir el primer punto de la meseta.<br>— Debe haber al menos una reducción del 20 % en la actividad respecto al valor máximo del patrón de referencia, Ral/E2 (es decir, 8 000 ULR o menos cuando el valor de la respuesta máxima del patrón de referencia (Ral/E2) se ajusta a 10 000 ULR).<br>— Las concentraciones no citotóxicas más altas del producto problema deben ser inferiores o iguales a $1 \times 10^{-5}$ M.<br>— Si es posible, deberá calcularse un valor de la $CI_{50}$ para cada producto problema positivo. |
| Negativo | Todos los puntos de datos se sitúan por encima del valor $CE_{80}$ (80 % de la respuesta del E2 u 8 000 ULR), a concentraciones inferiores a $1{,}0 \times 10^{-5}$ M. |
| Inadecuado | Se considera que los datos que no pueden interpretarse como válidos para demostrar la presencia o la ausencia de actividad por limitaciones cualitativas o cuantitativas importantes son inadecuados y no pueden utilizarse para determinar si el producto problema es positivo o negativo. El producto debe someterse a ensayo de nuevo. |

▼**M8**

40. Los resultados positivos se caracterizarán tanto por la magnitud del efecto como por la concentración a la que se produce el efecto, cuando sea posible. En las figuras 5 y 6 se muestran ejemplos de datos positivos, negativos e inadecuados.

*Figura 5*

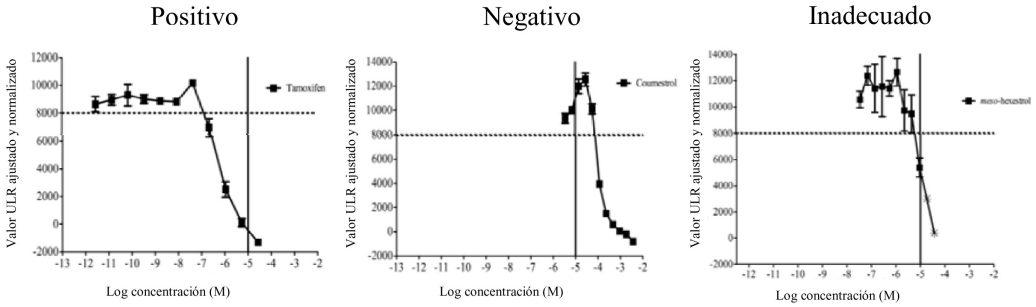
**Ejemplos de agonistas: datos positivos, negativos e inadecuados**




La línea discontinua indica el 20 % de la respuesta del E2, 2 000 ULR ajustadas y normalizadas.

*Figura 6*

**Ejemplos de antagonistas: datos positivos, negativos e inadecuados**




La línea discontinua indica el 80 % de la respuesta del Ral/E2, 8 000 ULR ajustadas y normalizadas.

La línea continua indica 1,00 x $10^{-5}$ M. Para que una respuesta se considere positiva, debe estar por debajo de la línea de 8 000 ULR y a concentraciones inferiores a 1,00 x $10^{-5}$ M.

Las concentraciones indicadas con asteriscos en la gráfica del meso-hexestrol indican unas puntuaciones de viabilidad iguales o superiores a «2».

Se considera que los resultados de los ensayos del ensayo correspondientes al meso-hexestrol son inadecuados porque la única respuesta que se encuentra por debajo de 8 000 ULR se da a la concentración de 1,00 x $10^{-5}$ M.

41. Los cálculos de $CE_{50}$ y $CI_{50}$ pueden hacerse utilizando una función de Hill de cuatro parámetros [véanse más detalles en el protocolo de agonistas y en el de antagonistas (7)]. El cumplimiento de los criterios de aceptabilidad indica que el sistema funciona correctamente, pero no garantiza que cualquier tanda de ensayo concreta produzca datos exactos. La duplicación de los resultados de la primera tanda es la mejor garantía de que se han producido datos exactos (véase el punto 19 de la sección «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA».

▼**M8**

INFORME DEL ENSAYO

42. Véase el punto 20 de la sección «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA».

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) ICCVAM. (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report on the LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Method for Identifying ER Agonists and Antagonists, National Institute of Environmental Health Sciences: Research Triangle Park, NC.

(2) Monje P., Boland R. (2001). Subcellular Distribution of Native Estrogen Receptor α and β Isoforms in Rabbit Uterus and Ovary, J. Cell Biochem., 82(3): 467-479.

(3) Pujol P., *et al.* (1998). Differential Expression of Estrogen Receptor-Alpha and -Beta Messenger RNAs as a Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis, Cancer Res., 58(23): 5367-5373.

(4) Weihua Z., *et al.* (2000). Estrogen Receptor (ER) β, a Modulator of ERα in the Uterus, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(11): 936-5941.

(5) Balls M., *et al.* (2006). The Importance of Good Cell Culture Practice (GCCP), ALTEX, 23(Suppl): p. 270-273.

(6) Coecke S., *et al.* (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice: a Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice, Alternatives to Laboratory Animals, 33: p. 261-287.

(7) ICCVAM (2011). ICCVAM Test Method Evaluation Report, The LUMI-CELL® ER (BG1Luc ER TA) Test Method: An *In Vitro* Assay for Identifying Human Estrogen Receptor Agonist and Antagonist Activity of Chemicals, NIH Publication No 11-7 850.

(8) Rogers J.M., Denison M.S. (2000). Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals*, In Vitro* Mol. *Toxicol*.,13(1):67-82.

(9) Escande A., *et al.* (2006). Evaluation of Ligand Selectivity Using Reporter Cell Lines Stably Expressing Estrogen Receptor Alpha or Beta, Biochem. *Pharmacol*., 71(10):1459-69.

(10) Thorne N., Inglese J., Auld D.S. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology,17(6):646-57.

(11) Kuiper G.G, *et al.* (1998). Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor Beta, Endocrinology,139(10):4252-63.

(12) Geisinger, *et al.* (1989). Characterization of a human ovarian carcinoma cell line with estrogen and progesterone receptors, Cancer 63, 280-288.

(13) Baldwin, *et al.* (1998). BG-1 ovarian cell line: an alternative model for examining estrogen-dependent growth *in vitro*, *In Vitro* Cell. Dev. Biol. – Animal, 34, 649-654.

(14) Li, Y., *et al.* (2014). Research resource: STR DNA profile and gene expression comparisons of human BG-1 cells and a BG-1/MCF-7 clonal variant, Mol. Endo. 28, 2072-2081.

(15) Rogers, J.M. and Denison, M.S. (2000). Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenicand anti-estrogenic chemicals, *In Vitro* & Molec. Toxicol. 13, 67-82.

▼**M8**

*Apéndice 4*

ENSAYO DE TRANSACTIVACIÓN DEL RECEPTOR ESTROGÉNICO A HUMANO TRANSFECTADO ESTABLEMENTE PARA LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD AGONISTA Y ANTAGONISTA DE LOS PRODUCTOS, UTILIZANDO LA LÍNEA CELULAR ERA CALUX

CONSIDERACIONES Y LIMITACIONES INICIALES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo de transactivación ERα CALUX utiliza la línea celular U2OS humana para detectar la actividad de agonistas y antagonistas estrogénicos mediada a través del receptor estrogénico humano alfa (hERα). El estudio de validación del bioensayo ERα CLUX con transfección estable realizado por BioDetection Systems BV (Amsterdam, Países Bajos) puso de manifiesto la pertinencia y la fiabilidad del ensayo para su finalidad prevista (1). La línea celular ERα CALUX expresa solo el ERα humano con transfección estable (2) (3).

2. Este ensayo está diseñado específicamente para detectar la transactivación mediada a través del hERα midiendo la bioluminiscencia como parámetro. La bioluminiscencia se utiliza normalmente en los bioensayos debido a la alta relación señal-ruido (4).

3. Se ha notificado que las concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 μM sobreactivan el gen marcador de la luciferasa, lo que da lugar a una luminiscencia no mediada por el receptor (5) (6) (7). Por tanto, en los ensayos de transactivación del ER con transfección estable hay que examinar cuidadosamente las concentraciones más elevadas de fitoestrógenos u otros compuestos similares que puedan sobreactivar la expresión de la luciferasa (véase el apéndice 2).

4. Las secciones «INTRODUCCIÓN GENERAL» y «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA» deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

5. El bioensayo se utiliza para evaluar la unión de un ligando al ER, seguida por la translocación del complejo receptor-ligando al núcleo. En el núcleo, el complejo receptor-ligando se une a determinados elementos específicos de respuesta del ADN y transactiva un gen marcador de la luciferasa de la luciérnaga, lo que provoca un aumento de la expresión celular de la enzima luciferasa. Como consecuencia de la adición del sustrato de la luciferasa, que es la luciferina, esta se transforma en un producto bioluminiscente. La luz producida puede detectarse y cuantificarse fácilmente con un luminómetro.

6. El sistema de ensayo utiliza células CALUX transfectadas de forma estable. Las células ERα CALUX proceden de la línea celular U2OS de osteosarcoma osteoblástico humano. Las células U2OS humanas se han transfectado de forma estable con 3 x HRE-TAT-Luc y pSG5-neo-hERα utilizando el método de coprecipitación con fosfato de calcio. Se ha seleccionado la línea celular U2OS como el mejor candidato para servir de línea celular marcadora sensible a los estrógenos (y a otras hormonas esteroideas), basándose en la observación de que la línea celular U2OS mostraba poca o ninguna actividad de receptores endógenos. La ausencia de receptores endógenos se evaluó utilizando únicamente plásmidos de marcador de luciferasa, sin que se pusiera de manifiesto actividad alguna cuando se añadían los ligandos de los receptores. Además, esta línea celular permitía fuertes respuestas medidas por hormonas, cuando se introducían con carácter transitorio receptores análogos (2) (3) (8).

7. El ensayo de productos para detectar su actividad estrogénica o antiestrogénica utilizando la línea celular ERα CALUX incluye una tanda de precribado y unas tandas completas. Durante la tanda de precribado se determina la solubilidad, la citotoxicidad y el intervalo afinado de concentraciones para el

▼M8

ensayo completo. Durante las tandas completas, se someten a ensayo los intervalos afinados de concentración de los productos problema según el bioensayo ERα CALUX, seguido de la clasificación de los productos problema en cuanto a su agonismo o antagonismo.

8. Los criterios para la interpretación de los datos se describen con detalle en el punto 59. En resumen, el producto problema se considera positivo como agonista en el caso de que al menos dos concentraciones consecutivas suyas muestren una respuesta igual o superior al 10 % de la respuesta máxima del patrón de referencia 17β-estradiol ($CP_{10}$). El producto problema se considera positivo como antagonista en el caso de que al menos dos concentraciones consecutivas suyas muestren una respuesta igual o inferior al 80 % de la respuesta máxima del patrón de referencia tamoxifeno ($CP_{80}$).

PROCEDIMIENTO

**Línea celular**

9. Debe utilizarse para el ensayo la línea celular ERα CALUX de U2OS, transfectada de forma estable. La línea celular puede obtenerse de BioDetection Systems BV, Amsterdam, Países Bajos, mediante un acuerdo de licencia técnica.

10. Solo deben utilizarse cultivos celulares libres de micoplasmas. Los lotes usados de células deben estar certificados como negativos en cuanto a la contaminación por micoplasmas, o bien antes de su uso debe llevarse a cabo un ensayo para excluir la presencia de estos. Debe utilizarse la RCP-TR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) para la detección sensible de la infección por micoplasmas (9).

**Estabilidad de la línea celular**

11. Para mantener la estabilidad y la integridad de las células CALUX, deben conservarse en nitrógeno líquido (-80°C). Tras descongelarlas para iniciar un nuevo cultivo, las células deben subcultivarse al menos dos veces antes de utilizarse para evaluar los productos en cuanto a su actividad como agonista y antagonista estrogénico. Las células no se deben subcultivar a lo largo de más de treinta pases.

12. Para supervisar la estabilidad de la línea celular a lo largo del tiempo, debe verificarse la sensibilidad del sistema de ensayo de agonistas y antagonistas mediante la evaluación del patrón de referencia ($CE_{50}$ o $CI_{50}$). Además, debe supervisarse la inducción relativa de la muestra de testigo positivo (TP) y la muestra de testigo negativo (TN). Los resultados deben estar de acuerdo con los criterios de aceptación para el bioensayo CELUX de agonistas (cuadro 3C) o antagonistas (cuadro 4C). Los patrones de referencia, testigos positivos y negativos, figuran en el cuadro 1 y en el cuadro 2, en relación con el modo agonista y el modo antagonista.

**Condiciones de cultivo y siembra de las células**

13. Las células U2OS se deben cultivar en medio de cultivo [DMEM/F12 (1: 1) con rojo de fenol como indicador de pH, complementado con suero bovino fetal (7,5 %), aminoácidos no esenciales (1 %), 10 unidades/ml de penicilina, estreptomicina y geneticina (G-418) como marcador de selección]. Las células deben colocarse en una incubadora con $CO_2$ (5 % de $CO_2$) a 37,0°C y 100 % de humedad. Cuando las células alcancen una confluencia del 85-95 %, deben subcultivarse o prepararse para la siembra en placas de microvaloración de 96 pocillos. En este último caso, las células se deben resuspender a la concentración de 1 x $10^5$ células/ml en medio de ensayo libre de estrógenos [DMEM/F12 (1: 1) sin rojo de fenol, complementado con suero bovino fetal tratado con carbón recubierto de dextrano (5 % v/v), aminoácidos no esenciales (1 % v/v), 10 unidades/ml de penicilina y estreptomicina] y ponerse en los pocillos de placas de microvaloración de 96 pocillos (100 µl de suspensión homogeneizada de células). Las células deben preincubarse en una incubadora de $CO_2$ (5 % de $CO_2$, 37,0°C, 100 % de humedad) durante 24 horas antes de la exposición. Los artículos de plástico deben estar libres de estrógenos.

▼M8

**Criterios de aceptabilidad**

14. Se somete a ensayo el producto o productos problema en cuanto a su actividad como agonista y antagonista. Una serie de ensayo consiste en un máximo de 6 placas de microvaloración. Cada serie de ensayo contiene al menos una serie completa de diluciones de un patrón de referencia, una muestra de testigo positivo, una muestra de testigo negativo y controles del disolvente. Las figuras 1 y 2 describen la disposición de las placas para las series de pruebas de agonistas y antagonistas.

15. Debe analizarse por triplicado cada una de las diluciones de los patrones de referencia, de los productos problema, de todos los controles del disolvente, y de los testigos positivos y negativos. Cada uno de los análisis por triplicado deberá cumplir los requisitos que figuran en los cuadros 3A y 4A.

16. En la primera placa de cada serie de ensayo se mide una serie completa de diluciones del patrón de referencia (17β-estradiol para los agonistas; tamoxifeno para los antagonistas). A fin de poder comparar los resultados del análisis de las otras cinco placas de microvaloración con la primera placa de microvaloración que contiene la curva completa concentración-respuesta del patrón de referencia, todas las placas deben contener 3 muestras de control: control del disolvente, concentración más alta del patrón de referencia sometida a ensayo, y la concentración aproximada $CE_{50}$ (agonistas) o $CI_{50}$ (antagonistas) del patrón de referencia. La relación entre las muestras de control medias en la primera placa y las otras cinco placas debe cumplir los requisitos indicados en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).

17. Se calcula el factor z de cada una de las placas de microvaloración dentro de una serie de ensayo (10). El factor z debe calcularse utilizando las respuestas obtenidas a las concentraciones más alta y más baja del patrón de referencia. Una placa de microvaloración se considera válida en caso de que cumpla los requisitos establecidos en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).

18. El patrón de referencia debe presentar una curva dosis-respuesta sigmoidea. Los valores de $CE_{50}$ o $CI_{50}$ derivados de la respuesta de la serie de diluciones del patrón de referencia deben cumplir los requisitos indicados en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).

19. Cada serie de ensayo debe contener una muestra de testigo positivo y una muestra de testigo negativo. La inducción relativa calculada con la muestra de testigo tanto positivo como negativo debe cumplir los requisitos indicados en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).

20. Durante todas las mediciones, el factor de inducción de la concentración más alta del patrón de referencia debe medirse dividiendo la media de la respuesta máxima en unidades luminosas relativas (ULR) del patrón de referencia, 17β-estradiol, por la media de la respuesta en ULR del control del disolvente de referencia. Este factor de inducción debe cumplir los requisitos mínimos aplicables al factor de inducción que se indican en el cuadro 3C (agonistas) o en el cuadro 4C (antagonistas).

21. Solo las placas de microvaloración que cumplan todos los criterios de aceptación antes mencionados se consideran válidas y pueden utilizarse para evaluar la respuesta de los productos problema.

22. Los criterios de aceptación son aplicables tanto a las tandas de precribado como a las tandas de los ensayos completos.

▼M8

*Cuadro 1*

**Concentraciones de patrón de referencia, testigo positivo (TP) y testigo negativo (TN) para el bioanálisis CALUX de agonistas**

| | Sustancia | N.º CAS | Intervalo de ensayo (M) |
|---|---|---|---|
| Patrón de referencia | 17β-Estradiol | 50-28-2 | $1 * 10^{-13}$ - $1 * 10^{-10}$ |
| Testigo positivo (TP) | 17α-Metiltestosterona | 58-18-4 | $3 * 10^{-6}$ |
| Testigo negativo (TN) | Corticosterona | 50-22-6 | $1 * 10^{-8}$ |

*Cuadro 2*

**Concentraciones de patrón de referencia, testigo positivo (TP) y testigo negativo (TN) para el bioanálisis CALUX de antagonistas**

| | Sustancia | N.º CAS | Intervalo de ensayo (M) |
|---|---|---|---|
| Patrón de referencia | Tamoxifeno | 10540-29-1 | $3 * 10^{-9}$ - $1 * 10^{-5}$ |
| Testigo positivo (TP) | 4-Hidroxitamoxifeno | 68047-06-3 | $1 * 10^{-9}$ |
| Testigo negativo (TN) | Resveratrol | 501-36-0 | $1 * 10^{-5}$ |

*Cuadro 3*

**Criterios de aceptación para el bioensayo ERα CALUX de agonistas**

| **A — Muestras individuales en una placa** | | **Criterio** |
|---|---|---|
| 1 | DT % máxima de los pocillos triplicados (de TN, TP, de cada dilución del producto problema y del patrón de referencia, excepto C0) | < 15 % |
| 2 | DT % máxima de los pocillos triplicados [del patrón de referencia y de los controles del disolvente del producto problema (C0, CD)] | < 30 % |
| 3 | Pérdida máxima de LDH como medida de la citotoxicidad | < 120 % |
| **B — Dentro de una sola placa de microvaloración** | | |
| 4 | Relación entre el control del disolvente del patrón de referencia (C0; placa 1) y el control del disolvente del producto problema (CD; placas 2 a x) | 0,5 a 2,0 |
| 5 | Relación de las concentraciones aprox. $CE_{50}$ y máxima del patrón de referencia en la placa 1 y las concentraciones aprox. $CE_{50}$ y máxima del patrón de referencia en las placas 2 a x (C4, C8) | 0,70 a 1,30 |
| 6 | Factor z de cada placa | > 0,6 |
| **C — Dentro de una sola serie de análisis (todas las placas de una serie)** | | |
| 7 | Curva sigmoidea del patrón de referencia | Sí (17ß-estradiol) |
| 8 | Intervalo de $CE_{50}$ del patrón de referencia 17ß-estradiol | $4 * 10^{-12}$ - $4 * 10^{-11}$ M |
| 9 | Factor mínimo de inducción de la mayor concentración de 17ß-estradiol, respecto al control del disolvente del patrón de referencia | 5 |
| 10 | Inducción relativa (%) del TP | > 30 % |
| 11 | Inducción relativa (%) del TN | < 10 % |

▼M8

Aprox.: aproximado; TP: testigo positivo; TN: testigo negativo; CD: control del disolvente del producto problema; C0: control del disolvente del patrón de referencia; DT: desviación típica; LDH: lactato-deshidrogenasa.

*Cuadro 4*

**Criterios de aceptación para el bioensayo ERα CALUX de antagonistas**

| **A — Muestras individuales en una placa** | | **Criterio** |
|---|---|---|
| 1 | DT % máxima de los pocillos triplicados [de TN, TP, de cada dilución del producto problema y del patrón de referencia, control del disolvente (C0)] | < 15 % |
| 2 | DT % máxima de los pocillos triplicados [del control del vehículo (CVe) y de la concentración máxima del patrón de referencia (C8)] | < 30 % |
| 3 | Pérdida máxima de LDH como medida de la citotoxicidad | < 120 % |
| **B — Dentro de una sola placa de microvaloración** | | |
| 4 | Relación entre el control del disolvente del patrón de referencia (C0; placa 1) y el control del disolvente del producto problema (CD; placas 2 a x) | 0,70 a 1,30 |
| 5 | Relación de las concentraciones aprox. $CI_{50}$ del patrón de referencia en la placa 1 y las concentraciones aprox. $CI_{50}$ del patrón de referencia en las placas 2 a x (C4) | 0,70 a 1,30 |
| 6 | Relación de las concentraciones máximas del patrón de referencia en la placa 1 y las concentraciones máximas del patrón de referencia en las placas 2 a x (C8) | 0,50 a 2,0 |
| 7 | Factor z de cada placa | > 0,6 |
| **C — Dentro de una sola serie de análisis (todas las placas de una serie)** | | |
| 8 | Curva sigmoidea del patrón de referencia | Sí (tamoxifeno) |
| 9 | Intervalo de $CI_{50}$ del patrón de referencia (tamoxifeno) | $1 * 10^{-8}$ - $1 * 10^{-7}$ M |
| 10 | Factor mínimo de inducción del control del disolvente del patrón de referencia, con respecto a la concentración más alta de tamoxifeno | 2,5 |
| 11 | Inducción relativa (%) del TP | < 70 % |
| 12 | Inducción relativa (%) del TN | > 85 % |

Aprox.: aproximado; TP: testigo positivo; TN: testigo negativo; CVe: control del vehículo (control del disolvente sin concentración fija del patrón de referencia de agonista); CD: control del disolvente del producto problema; C0: control del disolvente del patrón de referencia; DT: desviación típica; LDH: lactato-deshidrogenasa.

**Control del disolvente/vehículo, patrones de referencia, testigos positivos, testigos negativos**

23. Debe utilizarse el mismo control del disolvente/vehículo, patrones de referencia, testigos positivos y testigos negativos tanto en la tanda de precribado como en las tandas de los ensayos completos. Además, la concentración de los patrones de referencia, testigos positivos y testigos negativos debe ser la misma.

▼**M8**

*Control del disolvente*

24. El disolvente que se utilice para disolver los productos problema debe someterse a ensayo como control del disolvente. El dimetilsulfóxido [DMSO, 1 % (v/v); n.º CAS 67-68-5] se utilizó como vehículo durante la validación del bioensayo ERα CALUX. Si se utiliza un disolvente distinto del DMSO, todos los patrones de referencia, testigos y productos problema deben ensayarse con el mismo vehículo. Téngase en cuenta que el control del disolvente para los estudios de antagonistas contiene una concentración fija del patrón de referencia agonista, que es el 17β-estradiol ($CE_{50}$ aproximada). Para comprobar el disolvente utilizado en los estudios de antagonistas, debe prepararse y ensayarse un control del vehículo.

*Control del vehículo (antagonistas)*

25. Para los estudios de antagonistas, el medio de ensayo tiene el complemento de una concentración fija del patrón de referencia agonista, que es el 17β-estradiol ($CE_{50}$ aproximada). A fin de comprobar el disolvente utilizado para disolver los productos problema del estudio de antagonistas, debe prepararse un medio de ensayo sin una concentración fija del patrón de referencia agonista, que es el 17β-estradiol. Esta muestra de control se indica como control del vehículo. El dimetilsulfóxido [DMSO, 1 % (v/v); n.º CAS 67-68-5] se utilizó como vehículo durante la validación del bioensayo ERα CALUX. Si se utiliza un disolvente distinto del DMSO, todos los patrones de referencia, testigos y productos problema deben ensayarse con el mismo vehículo.

*Patrones de referencia*

26. El patrón de referencia de los agonistas es el 17β-estradiol (cuadro 1). Los patrones de referencia comprenden una serie de diluciones de ocho concentraciones de 17β-estradiol ($1 * 10^{-13}$, $3 * 10^{-13}$, $1 * 10^{-12}$, $3 * 10^{-12}$, $6 * 10^{-12}$, $1 * 10^{-11}$, $3 * 10^{-11}$, $1 * 10^{-10}$ M).

27. El patrón de referencia de los antagonistas es el tamoxifeno (cuadro 2). Los patrones de referencia comprenden una serie de diluciones de ocho concentraciones de tamoxifeno ($3 * 10^{-9}$, $1 * 10^{-8}$, $3 * 10^{-8}$, $1 * 10^{-7}$, $3 * 10^{-7}$, $1 * 10^{-6}$, $3 * 10^{-6}$, $1 * 10^{-5}$ M). Cada una de las concentraciones del patrón de referencia de los antagonistas se incuba conjuntamente con una concentración fija del patrón de referencia de los agonistas, el 17β-estradiol ($3 * 10^{-12}$ M).

*Testigo positivo*

28. El testigo positivo de los estudios de agonistas es la 17α-metiltestosterona (cuadro 1).

29. El testigo positivo de los estudios de antagonistas es el 4-hidroxitamoxifeno (cuadro 2). El testigo positivo de los antagonistas se incuba conjuntamente con una concentración fija del patrón de referencia de los agonistas, el 17β-estradiol ($3 * 10^{-12}$ M).

*Testigo negativo*

30. El testigo negativo de los estudios de agonistas es la corticosterona (cuadro 1).

31. El testigo negativo de los estudios de antagonistas es el resveratrol (cuadro 2). El testigo negativo de los antagonistas se incuba conjuntamente con una concentración fija del patrón de referencia de los agonistas, el 17β-estradiol ($3 * 10^{-12}$ M).

▼M8

Demostración de la competencia del laboratorio (véanse el punto 14 y los cuadros 3 y 4 de la sección «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA» del presente método de ensayo)

**Vehículo**

32. El disolvente utilizado para disolver los productos problema debe solubilizarlos completamente y ser miscible con el medio celular. Son disolventes adecuados el DMSO, el agua y el etanol (del 95 % al 100 % de pureza). En caso de que se emplee el DMSO como disolvente, su concentración máxima durante la incubación no debe superar el 1 % (v/v). Antes de su utilización, el disolvente debe someterse a ensayo para comprobar la ausencia de citotoxicidad y de interferencia con el comportamiento del ensayo.

**Preparación de los patrones de referencia, testigos positivos, testigos negativos y productos problema**

33. Se disuelven en 100 % de DMSO (o un disolvente adecuado) los patrones de referencia, los testigos positivos, los testigos negativos y los productos problema. A continuación, deben prepararse diluciones (en serie) adecuadas en el mismo disolvente. Antes de su disolución, debe permitirse que todas las sustancias se equilibren a la temperatura ambiente. Las soluciones madre recién preparadas de los patrones de referencia, los testigos positivos, los testigos negativos y los productos problema no deben tener precipitado ni turbidez apreciables. Las soluciones madre de los patrones de referencia y de los testigos pueden prepararse en gran cantidad. Las soluciones madre de los productos problema deben prepararse de nuevo antes de cada experimento. Las diluciones finales de los patrones de referencia, testigos positivos, testigos negativos y productos problema deben prepararse de nuevo para cada experimento y utilizarse en las 24 horas siguientes a la preparación.

**Solubilidad, citotoxicidad y determinación del intervalo**

34. Durante la tanda de precribado se determina la solubilidad de los productos problema en el disolvente elegido. Se prepara una solución madre a la concentración máxima de 0,1 M. En caso de que esta concentración muestre problemas de solubilidad, deben prepararse soluciones madre más diluidas hasta que los productos problema estén completamente solubilizados. Durante la tanda de precribado, se someten a ensayo diluciones de producto problema en serie 1: 10. La concentración máxima par el ensayo de agonistas o antagonistas es 1 mM. Tras realizar el precribado, se obtiene un intervalo afinado de concentraciones de los productos problema para utilizarlo en las tandas de los ensayos completos. Las diluciones utilizadas para los ensayos completos deben ser de 1 x, 3 x, 10 x, 30 x, 100 x, 300 x, 1000 x y 3000 x.

35. El ensayo de citotoxicidad está incluido en el protocolo de ensayo de agonistas y antagonistas (11). El ensayo de citotoxicidad se incorpora tanto a la tanda de precribado como a las tandas de ensayos completos. El método utilizado para evaluar la citotoxicidad durante la validación del bioensayo del ERα CALUX es la prueba de pérdida de lactato-deshidrogenasa (LDH) combinada con la inspección visual cualitativa de las células (véase el apéndice 4.1) tras la exposición a los productos problema. No obstante, pueden utilizarse otros métodos cuantitativos para la determinación de la citotoxicidad [por ejemplo, el ensayo colorimétrico con tetrazolio (MTT) o el bioensayo CALUX de citotoxicidad]. En general, las concentraciones del producto problema que muestran una reducción de más del 20 % de de la viabilidad celular se consideran citotóxicas, por lo que no pueden utilizarse para la evaluación de los datos. Por lo que respecta al ensayo de pérdida de LDH, se considera que la concentración del producto problema es citotóxica cuando el porcentaje de pérdida de LDH es superior al 120 %.

▼**M8**

**Exposición al producto problema y organización de la placa del ensayo**

36. Tras la tripsinización de un matraz confluente de células cultivadas, las células se vuelven a suspender a la concentración de 1 x $10^5$ células/ml en medio de ensayo libre de estrógenos. En los pocillos interiores de una placa de microvaloración de 96 pocillos se siembran 100 µl de células resuspendidas. Los pocillos exteriores se llenan con 200 µl de solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) (véanse las figuras 1 y 2). Las placas se preincuban durante 24 horas en una incubadora de $CO_2$ (5 % de $CO_2$, 37ºC, 100 % de humedad).

37. Tras la preincubación, las placas se inspeccionan para comprobar visualmente la citotoxicidad (véase el apéndice 4.1), la contaminación y la confluencia. Solo se utilizan para el ensayo las placas que visualmente no muestren citotoxicidad ni contaminación y que presenten una confluencia del 85 % como mínimo. El medio de los pocillos interiores se retira cuidadosamente y se sustituye por 200 µl de medio de ensayo libre de estrógenos, con diluciones en serie apropiadas de los patrones de referencia, productos problema, testigos positivos, testigos negativosy controles del disolvente (cuadro 5: estudios de agonistas; cuadro 6: estudios de antagonistas). Todos los patrones de referencia, productos problema, testigos positivos, testigos negativos y controles de los disolventes se someten a ensayo por triplicado. En la figura 1 se indica la disposición de la placa para los ensayos de agonistas. En la figura 2 se indica la disposición de la placa para los ensayos de antagonistas. La disposición de la placa es la misma para las pruebas de precribado y para el ensayo completo. En los ensayos de antagonistas, todos los pocillos interiores, excepto los pocillos de control del vehículo (CVe), también contendrán una concentración fija del patrón de referencia agonista, el 17β-estradiol (3 * $10^{-12}$ M). Obsérvese que deben añadirse a cada placa de producto problema los patrones de referencia C8 y C4.

38. Tras la exposición de las células a todos los productos, las placas de microvaloración de 96 pocillos deben incubarse durante otras 24 horas en una incubadora de $CO_2$ (5 % $CO_2$, 37ºC, 100 % de humedad).

*Figura 1*

**Disposición de las placas de microvaloración de 96 pocillos para el precribado y la valoración del efecto agonista.**

**Placa 1**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | TP | |
| C | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | TP | |
| D | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | TP | |
| E | | C | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TN | |
| F | | C | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TN | |
| G | | C | TC1-1 | TC1-2 | TC1-3 | TC1-4 | TC1-5 | TC1-6 | TC1-7 | TC1-8 | TN | |
| H | | | | | | | | | | | | |

**Placas siguientes**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | C | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (máx) | |
| C | | C | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (máx) | |
| D | | C | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (máx) | |
| E | | C | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C4 (CE50) | |
| F | | C | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C4 (CE50) | |
| G | | C | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C4 (CE50) | |
| H | | | | | | | | | | | | |

C0 = disolvente del patrón de referencia;

C(1-8) = serie de diluciones (1-8, concentración de baja a elevada) del patrón de referencia.

▼M8

TP = testigo positivo;

TN = testigo negativo;

TCx-(1-8) = diluciones (1-8, concentraciones de baja a elevada) del producto problema para la tanda de precribado y para la evaluación del efecto agonista del producto problema x.

CD = control del disolvente del producto problema (idealmente, el mismo disolvente que en C0, pero puede ser de otro lote).

Casillas grises = pocillos exteriores, llenados con 200 µl de PBS.

*Figura 2*

**Disposición de las placas de microvaloración de 96 pocillos para el precribado de antagonistas y la valoración del efecto antagonista.**

**Placa 1**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | CVe | |
| C | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | CVe | |
| D | | C0 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | CVe | |
| E | | TN | TC1- | TC1-2 | TC1-3 | TC | TC1-5 | TC1- | TC1- | TC1- | TP | |
| F | | TN | TC1- | TC1-2 | TC1-3 | TC | TC1-5 | TC1- | TC1- | TC1- | TP | |
| G | | TN | TC1- | TC1-2 | TC1-3 | TC | TC1-5 | TC1- | TC1- | TC1- | TP | |
| H | | | | | | | | | | | | |

**Placas siguientes**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | CD | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (máx) | |
| C | | CD | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (máx) | |
| D | | CD | TC2-1 | TC2-2 | TC2-3 | TC2-4 | TC2-5 | TC2-6 | TC2-7 | TC2-8 | C8 (máx) | |
| E | | C4 (CI50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (máx) | |
| F | | C4 (CI50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (máx) | |
| G | | C4 (CI50) | TCx-1 | TCx-2 | TCx-3 | TCx-4 | TCx-5 | TCx-6 | TCx-7 | TCx-8 | C8 (máx) | |
| H | | | | | | | | | | | | |

C0 = disolvente del patrón de referencia;

C(1-8) = serie de diluciones (1-8, concentración de baja a elevada) del patrón de referencia.

TN = testigo negativo;

TP = testigo positivo;

TCx-(1-8) = diluciones (1-8, concentraciones de baja a elevada) del producto problema para la tanda de precribado y para la evaluación del efecto agonista del producto problema x.

CD = control del disolvente del producto problema (idealmente, el mismo disolvente que en C0, pero puede ser de otro lote).

CVe = control del vehículo (control del disolvente sin concentración fija del patrón de referencia de agonista, 17β-estradiol).

Casillas grises = pocillos exteriores, llenados con 200 µl de PBS.

Nota: Todos los pocillos interiores, excepto los pocillos de control del vehículo (CVe), también contendrán una concentración fija del patrón de referencia agonista, el 17β-estradiol ($3{,}0 * 10^{-12}$ M).

**Medición de la luminiscencia**

39. La medición de la luminiscencia se describe con detalle en el protocolo del ensayo de agonistas y antagonistas (10). Debe retirarse el medio de los pocillos, y las células deben lisarse tras 24 horas de incubación, a fin de abrir la membrana celular y permitir la medición de la actividad de la luciferasa.

▼M8

40. Para medir la luminiscencia, este procedimiento requiere un luminómetro equipado con dos inyectores. La reacción de la luciferasa comienza al inyectarse el sustrato luciferina. La reacción se detiene mediante la adición de NaOH 0,2 M. La reacción se detiene para evitar que pase luminiscencia de un pocillo al otro.

41. La luz emitida de cada pocillo se expresa como unidades luminosas relativas (ULR) por pocillo.

**Tanda de precribado**

42. Los resultados del análisis de precribado se utilizan para determinar un intervalo afinado de concentraciones de los productos problema para los ensayos completos. En el protocolo de ensayo de agonistas y antagonistas (10) se describe en profundidad la evaluación de los resultados del análisis de precribado y la determinación del intervalo afinado de concentraciones de los productos problema para los ensayos completos. Aquí se ofrece un breve resumen de los procedimientos para determinar el intervalo de concentraciones de productos problema para los ensayos de agonistas y de antagonistas. Véanse en los cuadros 5 y 6 las orientaciones para el diseño de la serie de diluciones.

*Selección de las concentraciones para la evaluación de los efectos agonistas*

43. Durante la tanda de precribado, los productos problema deben someterse a ensayo en la serie de diluciones como se indica en los cuadros 5 (agonistas) y 6 (antagonistas). Todas las concentraciones deben ensayarse en pocillos por triplicado, siguiendo la disposición de la placa indicada en la figura 1 (agonistas) o 2 (antagonistas).

44. Solo los resultados de los análisis que cumplen los criterios de aceptación (cuadro 3) se consideran válidos y pueden utilizarse para evaluar la respuesta de los productos problema. En caso de que una o varias placas de microvaloración en una serie de análisis no cumplan los criterios de aceptación, deberán volver a analizarse las correspondientes placas de microvaloración. En caso de que la primera placa que contenga la serie completa de diluciones del patrón de referencia no supere los criterios de aceptación, habrá que volver a analizar la serie completa de ensayos (6 placas).

45. Los intervalos iniciales de concentración de los productos problema deben ajustarse y la tanda de precribado debe repetirse en caso de que:

— se observe citotoxicidad. El procedimiento de precribado debe repetirse con concentraciones menores no citotóxicas del producto problema.

— el precribado del producto problema no muestre una curva completa de dosis-respuesta, porque las concentraciones ensayadas generan la inducción máxima. La tanda de precribado debe repetirse con concentraciones menores del producto problema.

46. Cuando se observe una respuesta válida relacionada con la dosis, se debe seleccionar la concentración (más baja) a la que se haya observado la inducción máxima sin presencia de citotoxicidad. La concentración máxima del producto problema que se va a someter a las tandas del ensayo completo debe ser 3 veces esta concentración seleccionada.

47. Debe prepararse una serie completa de diluciones afinadas del producto problema con las fases de dilución indicadas en el cuadro 5, empezando por la mayor concentración anteriormente determinada.

▼**M8**

48. Los productos problema que no provoquen ningún efecto agonista deben someterse a ensayo en las tandas completas empezando por la mayor concentración no citotóxica que se haya identificado durante el precribado.

*Selección de las concentraciones para la evaluación de los efectos antagonistas*

49. Solo los resultados de los análisis que cumplen los criterios de aceptación (cuadro 4) se consideran válidos y pueden utilizarse para evaluar la respuesta de los productos problema. En caso de que una o varias placas de microvaloración en una serie de análisis no cumplan los criterios de aceptación, deberán volver a analizarse las correspondientes placas de microvaloración. En caso de que la primera placa que contenga la serie completa de diluciones del patrón de referencia no supere los criterios de aceptación, habrá que volver a analizar la serie completa de ensayos (6 placas).

50. Los intervalos iniciales de concentración de los productos problema deben ajustarse y la tanda de precribado debe repetirse en caso de que:

— se observe citotoxicidad. El procedimiento de precribado debe repetirse con concentraciones menores no citotóxicas del producto problema.

— el precribado del producto problema no muestre una curva completa de dosis-respuesta, porque las concentraciones ensayadas generan la inhibición máxima. El precribado debe repetirse con concentraciones menores del producto problema.

51. Cuando se encuentre una respuesta válida relacionada con la dosis, se debe seleccionar la concentración (más baja) a la que se haya observado la inhibición máxima sin presencia de citotoxicidad. La concentración máxima del producto problema que se va a someter a las tandas del ensayo completo debe ser 3 veces esta concentración seleccionada.

52. Debe prepararse una serie completa de diluciones afinadas del producto problema con las fases de dilución indicadas en el cuadro 6, empezando por la mayor concentración anteriormente determinada.

53. Los productos problema que no provoquen ningún efecto antagonista deben someterse a ensayo en las tandas completas empezando por la mayor concentración no citotóxica que se haya identificado durante el precribado.

**Tandas completas**

54. Tras la selección de los intervalos afinados de concentraciones, los productos problema deben someterse al ensayo completo en la serie de diluciones que se indica en los cuadros 5 (agonistas) y 6 (antagonistas). Todas las concentraciones deben ensayarse en pocillos por triplicado, siguiendo la disposición de la placa indicada en la figura 1 (agonistas) o 2 (antagonistas).

55. Solo los resultados de los análisis que cumplan los criterios de aceptación (cuadros 3 y 4) se consideran válidos y pueden utilizarse para evaluar la respuesta de los productos problema. En caso de que una o varias placas de microvaloración en una serie de análisis no cumplan los criterios de aceptación, deberán volver a analizarse las correspondientes placas de microvaloración. En caso de que la primera placa que contenga la serie completa de diluciones del patrón de referencia no supere los criterios de aceptación, habrá que volver a analizar la serie completa de ensayos (6 placas).

▼**M8**

*Cuadro 5*

**Concentración y diluciones de los patrones de referencia, testigos y productos problema utilizados para los ensayos de agonistas**

| Concentración (M) del 17β-estradiol de referencia | | Dilución del TCx en la tanda de precribado | | Dilución del TCx en el ensayo completo | | Concentración (M) de los testigos | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C0 | 0 | TCx-1 | 10000000 x | TCx-1 | 3000 x | TP | $3 * 10^{-6}$ |
| C1 | $1 * 10^{-13}$ | TCx-2 | 1000000 x | TCx-2 | 1000 x | TN | $1 * 10^{-8}$ |
| C2 | $3 * 10^{-13}$ | TCx-3 | 100000 x | TCx-3 | 300 x | C0 | 0 |
| C3 | $1 * 10^{-12}$ | TCx-4 | 10000 x | TCx-4 | 100 x | CD | 0 |
| C4 | $3 * 10^{-12}$ | TCx-5 | 1000 x | TCx-5 | 30 x | | |
| C5 | $6 * 10^{-12}$ | TCx-6 | 100 x | TCx-6 | 10 x | | |
| C6 | $1 * 10^{-11}$ | TCx-7 | 10 x | TCx-7 | 3 x | | |
| C7 | $3 * 10^{-11}$ | TCx-8 | 1 x | TCx-8 | 1 x | | |
| C8 | $1 * 10^{-10}$ | | | | | | |

TCx: producto problema x.
TP: testigo positivo (17α-metiltestosterona).
TN: testigo negativo (corticosterona).
C0: control del disolvente del patrón de referencia.
CD: control del disolvente del producto problema.

▼**M8**

*Cuadro 6*

**Concentración y diluciones de los patrones de referencia, testigos y productos problema utilizados para los ensayos de antagonistas**

| Concentración (M) del tamoxifeno de referencia | | Dilución del TCx en la tanda de precribado | | Dilución del TCx en el ensayo completo | | Concentración (M) de los testigos | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C0 | 0 | TCx-1 | 10000000 x | TCx-1 | 3000 x | TP | $1 * 10^{-9}$ |
| C1 | $3 * 10^{-9}$ | TCx-2 | 1000000 x | TCx-2 | 1000 x | TN | $1 * 10^{-5}$ |
| C2 | $1 * 10^{-8}$ | TCx-3 | 100000 x | TCx-3 | 300 x | C0 | 0 |
| C3 | $3 * 10^{-8}$ | TCx-4 | 10000 x | TCx-4 | 100 x | CD | 0 |
| C4 | $1 * 10^{-7}$ | TCx-5 | 1000 x | TCx-5 | 30 x | | |
| C5 | $3 * 10^{-7}$ | TCx-6 | 100 x | TCx-6 | 10 x | **Concentración (M) del** | |
| C6 | $1 * 10^{-6}$ | TCx-7 | 10 x | TCx-7 | 3 x | **agonista complementado** | |
| C7 | $3 * 10^{-6}$ | TCx-8 | 1 x | TCx-8 | 1 x | 17β-Estradiol | $3 * 10^{-12}$ |
| C8 | $1 * 10^{-5}$ | | | | | | |

TCx: producto problema x.
TP: testigo positivo (4-hidroxitamoxifeno).
TN: testigo negativo (resveratrol).
C0: control del disolvente del patrón de referencia.
CD: control del disolvente del producto problema.
CVe: control del vehículo (no contiene una concentración fija del patrón de referencia de los agonistas, el 17β-estradiol ($3,0 * 10^{-12}$ M).

▼M8

**Recogida y análisis de los datos**

56. Tras las tandas de precribado y del ensayo completo, en el ensayo de agonistas deben determinarse los valores de $CE_{10}$, $CE_{50}$, $CP_{10}$, $CP_{50}$ e inducción máxima ($TCx_{máx}$) de un producto problema. En el ensayo de antagonistas deben calcularse los valores de $CI_{20}$, $CI_{50}$, $CP_{80}$, $CP_{50}$ e inducción mínima ($TCx_{mín}$). En las figuras 3 (agonistas) y 4 (antagonistas), se ofrece una representación gráfica de estos parámetros. Los parámetros requeridos se calculan sobre la base de la inducción relativa de cada producto problema [respecto a la inducción máxima del patrón de referencia (= 100 %)]. Para la evaluación de los datos, debe utilizarse una regresión no lineal (pendiente variable, cuatro parámetros) con arreglo a la ecuación siguiente:

$$Y = Valor\ inferior + \frac{(Valor\ superior - Valor\ inferior)}{(1 + 10^{((lgEC_{50} - X) \times pendiente\ de\ Hill)})}$$

donde:

X = log. de la dosis o de la concentración

Y = respuesta [inducción relativa (%)]

Valor superior = inducción máxima (%)

Valor inferior = inducción mínima (%)

Log $CE_{50}$ = log. de la concentración a la que se observa el 50 % de la respuesta máxima

Pendiente de Hill = factor de pendiente o pendiente de Hill.

57. Los datos brutos del luminómetro, expresados como unidades luminosas relativas (ULR), deben transferirse a la hoja de cálculo del análisis de los datos diseñada para las tandas de precribado y de ensayo completo. Los datos brutos deben cumplir los criterios de aceptación que se indican en los cuadros 3A y 3B (agonistas) o 4A y 4B (antagonistas). En el caso de que los datos brutos cumplan los criterios de aceptación, se efectuarán las siguientes etapas de cálculo para determinar los parámetros requeridos:

**Agonistas**

— Restar, de cada uno de los datos brutos del análisis de los patrones de referencia, el valor medio de ULR del control del disolvente del patrón de referencia.

— Restar, de cada uno de los datos brutos del análisis de los productos problema, el valor medio de ULR del control del disolvente del producto problema.

— Calcular la inducción relativa de cada concentración del patrón de referencia. Fijar en el 100 % la inducción de la concentración máxima del patrón de referencia.

— Calcular la inducción relativa de cada concentración de producto problema en comparación con la concentración máxima del patrón de referencia, que es el 100 %.

— Evaluar los resultados del análisis tras una regresión no lineal (pendiente variable, cuatro parámetros).

▼M8

— Determinar los valores $CE_{50}$ y $CE_{10}$ del patrón de referencia.

— Determinar los valores $CE_{50}$ y $CE_{10}$ de los productos problema.

— Determinar la inducción relativa máxima del producto problema ($TC_{máx}$).

— Determinar los valores de $CP_{10}$ y $CP_{50}$ de los productos problema.

En relación con los productos problema, puede que no siempre se consiga una curva dosis-respuesta completa debido, por ejemplo, a problemas de citotoxicidad o de solubilidad. Por tanto, no es posible determinar los valores $CE_{50}$, $CE_{10}$ y $TP_{50}$. En tal caso, solo pueden determinarse los valores de $CP_{10}$ y $TC_{máx}$

**Antagonistas**

— Restar, de cada uno de los datos brutos del análisis de los patrones de referencia, el valor medio de ULR de la mayor concentración del patrón de referencia.

— Restar, de cada uno de los datos brutos del análisis de los productos problema, el valor medio de ULR de la mayor concentración del patrón de referencia.

— Calcular la inducción relativa de cada concentración del patrón de referencia. Fijar en el 100 % la inducción de la concentración mínima del patrón de referencia.

— Calcular la inducción relativa de cada concentración de producto problema en comparación con la concentración mínima del patrón de referencia, que es el 100 %.

— Evaluar los resultados del análisis tras una regresión no lineal (pendiente variable, cuatro parámetros).

— Determinar los valores de $CI_{50}$ y $CI_{20}$ del patrón de referencia.

— Determinar los valores de $CI_{50}$ y $CI_{20}$ de los productos problema.

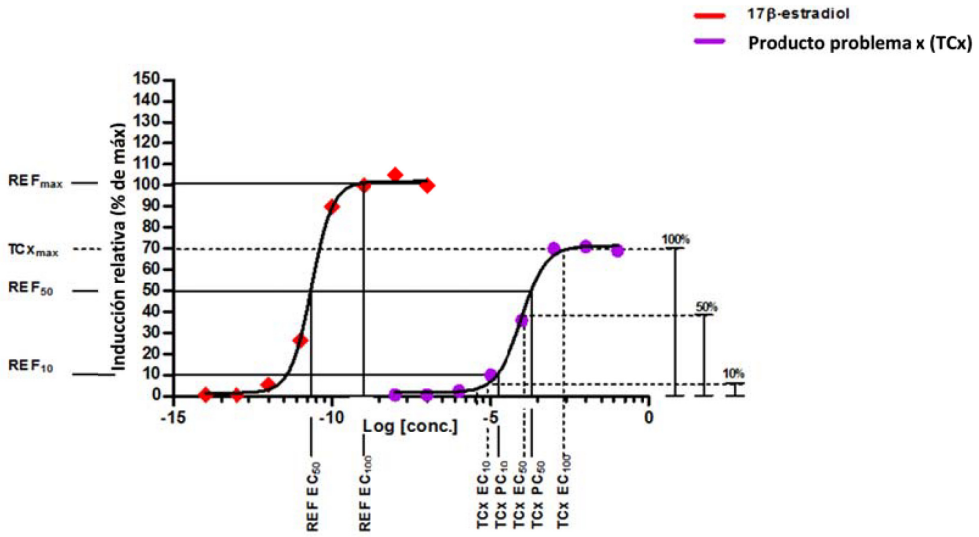
— Determinar la inducción relativa mínima del producto problema ($TC_{mín}$).

— Determinar los valores de $CP_{80}$ y $CP_{50}$ de los productos problema.

▼M8

*Figura 3*

**Visión general de los parámetros determinados en el ensayo de agonistas**




$CE_{10}$ = concentración de una sustancia a la que se observa el 10 % de su respuesta máxima.

$CE_{50}$ = concentración de una sustancia a la que se observa el 50 % de su respuesta máxima.

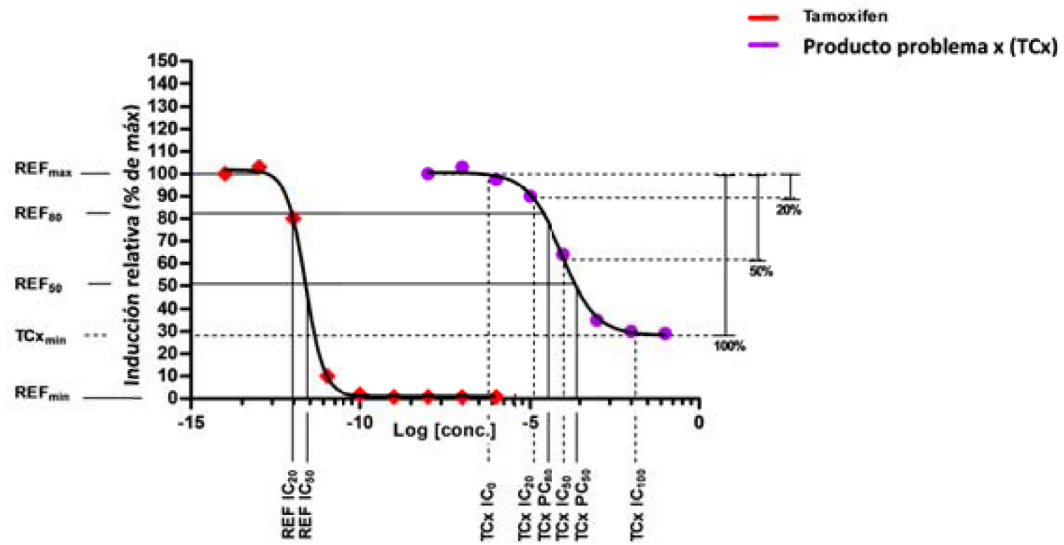
$CP_{10}$ = concentración de un producto problema a la que su respuesta es igual a la $CE_{10}$ del patrón de referencia.

$CP_{50}$ = concentración de un producto problema a la que su respuesta es igual a la $CE_{50}$ del patrón de referencia.

$TCx_{máx}$ = inducción relativa máxima del producto problema.

*Figura 4*

**Visión general de los parámetros determinados en el ensayo de antagonistas**




$CI_{20}$ = concentración de una sustancia a la que se observa el 80 % de su respuesta máxima (20 % de inhibición).

▼**M8**

$CI_{50}$ = concentración de una sustancia a la que se observa el 50 % de su respuesta máxima (50 % de inhibición).

$TP_{80}$ = concentración de un producto problema a la que su respuesta es igual a la $CI_{20}$ del patrón de referencia.

$TP_{50}$ = concentración de un producto problema a la que su respuesta es igual a la $CI_{50}$ del patrón de referencia.

$TCx_{mín}$ = inducción relativa mínima del producto problema.

En relación con los productos problema, puede que no siempre se consiga una curva dosis-respuesta completa debido, por ejemplo, a problemas de citotoxicidad o de solubilidad. Por tanto, no es posible determinar los valores $CI_{50}$, $CI_{20}$ y $TP_{50}$. En tal caso, solo pueden determinarse los valores $TP_{20}$ y $TC_{mín}$.

58. Los resultados deben basarse en dos (o tres) tandas independientes. Si dos tandas dan resultados comparables y, por lo tanto, reproducibles, no es necesario realizar una tercera tanda. Para ser aceptables, los resultados deben:

— cumplir los criterios de aceptabilidad (véanse los criterios de aceptabilidad, puntos 14-22),

— ser reproducibles.

**Criterios de interpretación de los datos**

59. Para interpretar los datos y tomar la decisión de si un producto problema se considera positivo o negativo, deben utilizarse los criterios siguientes:

Agonistas

En cada tanda del ensayo completo, se considera que un producto problema es **positivo** cuando:

1. El valor de $TC_{máx}$ es igual o superior al 10 % de la respuesta máxima del patrón de referencia ($REF_{10}$).

2. Al menos dos concentraciones consecutivas del producto problema son iguales o superiores a $REF_{10}$.

En cada tanda del ensayo completo, se considera que un producto problema es **negativo** cuando:

1. El valor de $TC_{máx}$ no supera el 10 % de la respuesta máxima del patrón de referencia ($REF_{10}$).

2. Son iguales o superiores a $REF_{10}$ menos de dos concentraciones del producto problema.

Antagonistas

En cada tanda del ensayo completo, se considera que un producto problema es **positivo** cuando:

1. El valor de $TC_{mín}$ es igual o inferior al 80 % de la respuesta máxima del patrón de referencia ($REF_{80}$ = 20 % de inhibición).

2. Al menos dos concentraciones consecutivas del producto problema son iguales o inferiores a $REF_{80}$.

▼**M8**

En cada tanda del ensayo completo, se considera que un producto problema es **negativo** cuando:

1. El valor de $TC_{mín}$ es superior al 80 % de la respuesta máxima del patrón de referencia ($REF_{80}$ = 20 % de inhibición).

2. Son iguales o inferiores a $REF_{80}$ menos de dos concentraciones del producto problema.

60. Para caracterizar la potencia de la respuesta positiva de un producto problema, deben indicarse la magnitud del efecto (agonistas: $TC_{máx}$; antagonistas: $TC_{mín}$) y la concentración a la que se produce el efecto (agonistas: $CE_{10}$, $CE_{50}$, $CP_{10}$, $CP_{50}$; antagonistas: $CI_{20}$, $CI_{50}$, $TP_{80}$, $TP_{50}$).

INFORME DEL ENSAYO

61. Véase el punto 20 de la sección «COMPONENTES DEL ENSAYO ER TA».

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2016). Draft Validation report of the (anti-) ERα CALUX bioassay - transactivation bioassay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 240). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(2) Sonneveld E, Jansen HJ, Riteco JA, Brouwer A, van der Burg B. (2005). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci.* 83(1), 136-148.

(3) Quaedackers ME, van den Brink CE, Wissink S, Schreurs RHMM, Gustafsson JA, van der Saag PT, and van der Burg B. (2001). 4-Hydroxytamoxifen trans-represses nuclear factor-kB Activity in human osteoblastic U2OS cells through estrogen receptor (ER)α and not through ERβ. *Endocrinology* 142(3), 1156-1166.

(4) Thorne N, Inglese J and Auld DS. (2010). Illuminating Insights into Firefly Luciferase and Other Bioluminescent Reporters Used in Chemical Biology, Chemistry and Biology17(6):646-57.

(5) Escande A, Pillon A, Servant N, Cravedi JP, Larrea F, Muhn P, Nicolas JC, Cavaillès V and Balaguer P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.,* 71, 1459-1469.

(6) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol.,* 139, 4252-4263.

(7) Sotoca AM, Bovee TFH, Brand W, Velikova N, Boeren S, Murk AJ, Vervoort J, Rietjens IMCM. (2010). Superinduction of estrogen receptor mediated gene expression in luciferase based reporter gene assays is mediated by a post-transcriptional mechanism. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.,* 122, 204–211.

(8) Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, Pieterse B, Brouwer A, Schoonen WG, and van der Burg B. (2006). Comparison of *in vitro* and *in vivo* screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol. Sci.,* 89(1), 173–187.

▼**M8**

(9) Kobayashi H, Yamamoto K, Eguchi M, Kubo M, Nakagami S, Wakisaka S, Kaizuka M and Ishii H. (1995). Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures by enzymatic detection of polymerase chain reaction (PCR) products. *J. Vet. Med. Sci.,* 57(4), 769-771.

(10) Zhang J-H, Chung TDY, and Oldenburg KR. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throuphut screening assays. J. Biomol. Scr., 4, 67-73

(11) Besselink H, Middelhof I, and Felzel, E. (2014). Transactivation assay for the detection of compounds with (anti)estrogenic potential using ERα CALUX cells. BioDetection Systems BV (BDS). Amsterdam, Países Bajos.

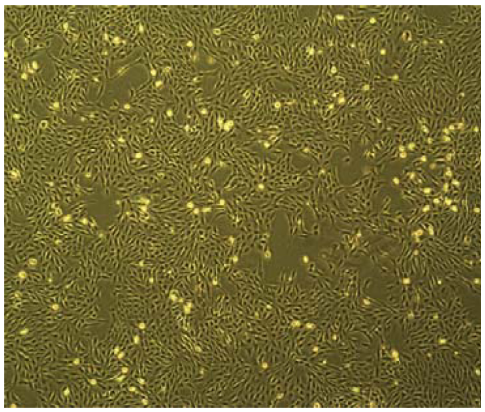
▼**M8**

*Apéndice 4.1*

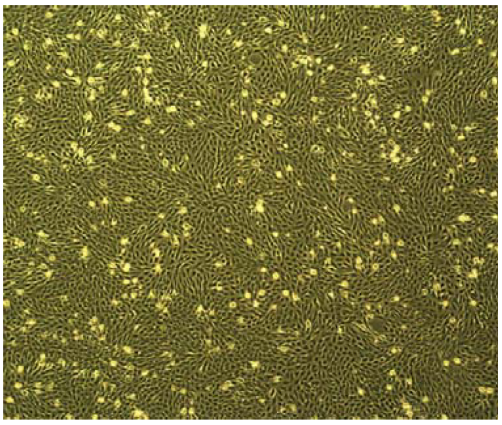
INSPECCIÓN VISUAL DE LA VIABILIDAD CELULAR



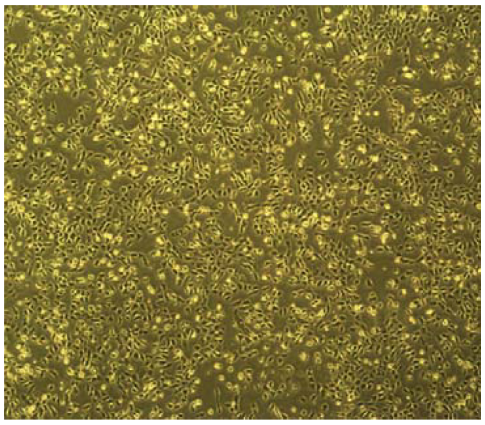
Confluencia < 5 %. Se acaban de sembrar las células. Viabilidad celular del 100 %. Clasificación: «sin citotoxicidad».



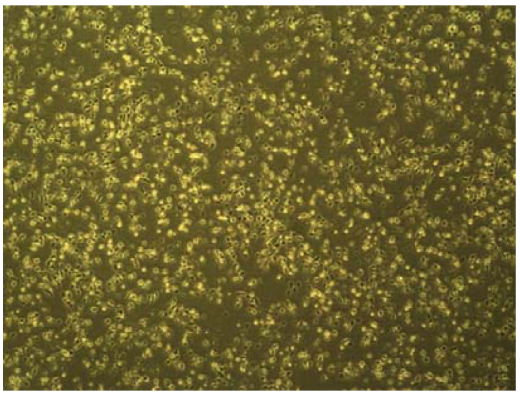
Confluencia > 85 %. En esta fase, las células se exponen a los productos problema. Viabilidad celular > 95 %.
Clasificación: «sin citotoxicidad».



Confluencia > 95 %. Las células están densamente empaquetadas y empiezan a crecer en exceso. Viabilidad celular > 95 %.
Clasificación: «sin citotoxicidad».



Viabilidad celular < 25 %. Las células se separan y disminuye el contacto entre ellas. Las células están redondeadas. Clasificación: «citotoxicidad».



Viabilidad celular < 5 %. Las células están totalmente separadas y está interrumpido el contacto entre ellas. Las células están redondeadas. Clasificación: «citotoxicidad».

▼M8

## B.67. ENSAYO DE MUTACIÓN GÉNICA DE CÉLULAS DE MAMÍFERO *IN VITRO* UTILIZANDO EL GEN DE LA TIMIDINA-CINASA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 490 de la OCDE (2016). Los métodos de ensayo se examinan y se revisan periódicamente a la luz del progreso científico, los cambios en las necesidades normativas y el bienestar animal. El ensayo con células de linfoma de ratón (MLA) y el ensayo con células TK6 utilizando el locus de la timidina-cinasa (TC) estaban originalmente incluidos en el método de ensayo B.17. Posteriormente, el grupo de trabajo de expertos MLA del Taller Internacional sobre Ensayos de Genotoxicidad (International Workshop for Genotoxicity Testing, IWGT) ha elaborado recomendaciones internacionalmente armonizadas en relación con los criterios de aceptación del ensayo y la interpretación de los datos respecto al ensayo MLA (1) (2) (3) (4) (5), y estas recomendaciones se incorporan en el presente y nuevo método de ensayo B.67. Este método de ensayo está escrito para el ensayo MLA y, dado que también utiliza el locus TK, para el ensayo TK6. Mientras que el MLA se ha utilizado ampliamente con fines normativos, el TK6 se ha utilizado mucho menos a menudo. Hay que señalar que, a pesar de la similitud entre los parámetros, las dos líneas celulares no son intercambiables y los programas normativos pueden expresar válidamente una preferencia por uno sobre el otro con vistas a un uso normativo particular. Por ejemplo, la validación del punto MLA demostró su adecuación para detectar no solo la mutación génica, sino también la capacidad de un producto problema para inducir una lesión cromosómica estructural. El presente método forma parte de una serie de métodos de ensayo sobre toxicología genética. La OCDE ha elaborado un documento que aporta información sucinta sobre los ensayos de toxicología genética y una síntesis de los recientes cambios aportados a las directrices de ensayo de la OCDE sobre toxicidad genética (6).

2. El objetivo de los ensayos de mutación génica con células de mamífero *in vitro* es detectar las mutaciones génicas inducidas por los productos. Las líneas celulares utilizadas en estos ensayos miden las mutaciones directas en genes marcadores y, en concreto, en el gen endógeno de la timidina-cinasa (TK en el caso de las células humanas y *Tk* en el caso de las células de roedores, denominadas conjuntamente *TK* en el presente método de ensayo). Este método de ensayo está diseñado para su uso con dos líneas celulares: la línea celular de linfoma de ratón L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C (generalmente denominada L5178Y) y la línea celular linfoblastoide humana TK6 (generalmente denominada TK6). Aunque las dos líneas celulares varían debido a su origen, crecimiento celular, situación de p53, etc., los ensayos de mutación génica *TK* pueden realizarse de forma similar con ambos tipos de células, tal como se describe en el presente método de ensayo.

3. La naturaleza autosómica y heterocigótica del gen de la timidina-cinasa permite detectar las colonias viables cuyas células sean deficientes en la enzima timidina-cinasa tras la mutación de $TK^{+/-}$ a $TK^{-/-}$. Esta deficiencia puede deberse a fenómenos genéticos que afecten al gen *TK*, incluidas las mutaciones génicas (mutaciones puntuales, mutaciones de desplazamiento del marco de lectura, pequeñas supresiones, etc.) y los fenómenos cromosómicos (supresiones grandes, reorganizaciones cromosómicas y recombinación mitótica). Estos últimos fenómenos se expresan como pérdida de heterocigosis, que es un cambio genético común de los genes supresores de tumores en la oncogénesis humana. En teoría, con el MLA puede detectarse la pérdida de todo el cromosoma portador del gen *TK* que resulta de la alteración del huso o de la ausencia de disyunción mitótica. De hecho, una combinación de análisis citogenético y molecular muestra claramente que algunos mutantes TK según el MLA son el resultado de una ausencia de disyunción. Sin embargo, la ponderación de las pruebas muestra que los ensayos de mutación del gen *TK* no pueden detectar con fiabilidad los anéugenos cuando se aplican los criterios de citotoxicidad normales (tal como se describen en el presente método de ensayo) y, por tanto, no es adecuado utilizar estos ensayos para detectar anéugenos (7) (8) (9).

▼**M8**

4. En las pruebas de mutación del gen *TK*, se generan dos clases fenotípicas distintas de mutantes *TK*; los mutantes de crecimiento normal, que crecen al mismo ritmo que las células heterocigóticas TK, y los mutantes de crecimiento lento, que crecen con tiempos de generación prolongados. Los mutantes de crecimiento normal y de crecimiento lento se reconocen como mutantes de colonias grandes y de colonias pequeñas en el análisis MLA y como mutantes de colonias de aparición temprana y de aparición tardía en el ensayo TK6. Debe estudiarse detenidamente la naturaleza molecular y citogenética de los mutantes MLA tanto de colonias grandes como de colonias pequeñas (8) (10) (11) (12) (13). También debe estudiarse a fondo la naturaleza molecular y citogenética de los mutantes TK6 tanto de aparición temprana como de aparición tardía (14) (15) (16) (17). Los mutantes de crecimiento lento de ambos tipos de células han sufrido lesiones genéticas que afectan al posible gen o genes de regulación del crecimiento cerca del locus *TK*, lo que da lugar a tiempos de generación prolongados y a la formación de colonias pequeñas o de aparición tardía (18). La inducción de mutantes de crecimiento lento se ha asociado con productos que inducen cambios estructurales macroscópicos a nivel cromosómico. Las células cuyas lesiones no afectan al posible gen o genes de regulación del crecimiento cerca del locus TK crecen a ritmos similares a los de las células parentales y se convierten en mutantes de crecimiento normal. La inducción de mutantes de crecimiento básicamente normal se asocia con productos que actúan fundamentalmente como mutágenos puntuales. Por consiguiente, es esencial recontar tanto los mutantes de crecimiento lento como los mutantes de crecimiento normal, a fin de aislar todos los mutantes y hacerse una idea del tipo o tipos de lesiones (mutágenos frente a clastógenos) inducidas por el producto problema (10) (12) (18) (19).

5. El método de ensayo se organiza de manera que proporcione información general aplicable tanto al ensayo MLA como al TK6, así como orientaciones especializadas para los distintos ensayos.

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

7. Los ensayos efectuados *in vitro* requieren generalmente el uso de una fuente exógena de activación metabólica. El sistema exógeno de activación metabólica no reproduce completamente las condiciones *in vivo*.

8. Hay que procurar evitar las condiciones que puedan llevar a la producción de resultados positivos que sean artefactos (es decir, debidos a la posible interacción con el sistema de ensayo), no causados por la interacción entre el producto problema y el material genético de la célula; pueden mencionarse entre tales condiciones los cambios de pH o de osmolalidad, la interacción con los componentes del medio (20) (21), o unos niveles excesivos de citotoxicidad (22) (23) (24). Se considera excesiva para el ensayo MLA y el TK6 la citotoxicidad que supere los niveles máximos recomendados de citotoxicidad que se definen en el punto 28. Además, debe tenerse en cuenta que los productos problema que sean análogos de la timidina, o se comporten como tales, pueden aumentar la frecuencia de la aparición de mutantes mediante un crecimiento selectivo de los mutantes espontáneos de fondo durante el tratamiento celular y exigir métodos de ensayo adicionales para una evaluación adecuada (25).

9. En caso de nanomateriales fabricados, puede ser necesario recurrir a adaptaciones específicas del presente método de ensayo, pero estas no se describen aquí.

10. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

▼M8

11. Las células mutantes deficientes en actividad enzimática de timidina-cinasa a causa de una mutación $TK^{+/-}$ a $TK^{-/-}$ son resistentes a los efectos citostáticos de la trifluorotimidina (TFT), análogo de la pirimidina. Las células capaces de producir timidina-cinasa son sensibles a la TFT, lo que inhibe el metabolismo celular y detiene la división celular. Así pues, las células mutantes son capaces de proliferar en presencia de TFT y forman colonias visibles, al contrario que las células que contienen la enzima TK.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

12. Se exponen al producto problema células en suspensión, tanto en presencia como en ausencia de una fuente exógena de activación metabólica (véase el punto 19), durante un plazo adecuado (véase el punto 33), y después se subcultivan para determinar la citotoxicidad y permitir la expresión fenotípica antes de la selección de los mutantes. La citotoxicidad se determina mediante el crecimiento relativo total (CRT, véase el punto 25) en el MLA y mediante la supervivencia relativa (SR, véase el punto 26) en el TK6. Los cultivos tratados se mantienen en un medio de crecimiento durante un período de tiempo suficiente y específico para cada tipo celular (véase el punto 37), de manera que la expresión fenotípica de las mutaciones inducidas sea casi óptima. Tras la expresión fenotípica, la frecuencia de mutantes se determina sembrando un número conocido de células en un medio con el agente selectivo para detectar las colonias de mutantes, y en otro medio sin dicho agente para determinar la eficiencia de clonación (viabilidad). Tras un período de incubación adecuado, se cuentan las colonias. La frecuencia de mutantes se calcula en función del número de colonias de mutantes, corregido para tener en cuenta la eficiencia de clonación, en el momento de la selección de los mutantes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Preparaciones**

*Células*

13. En cuanto al ensayo MLA: Dado que el ensayo MLA se ha desarrollado y caracterizado a partir de la sublínea $TK^{+/-}$ -3.7.2C de las células L5178Y, esta es la sublínea específica que debe utilizarse en el ensayo MLA. La línea celular L5178Y se ha obtenido a partir de un linfoma de timo inducido con metilcolantreno en un ratón DBA-2 (26). Clive y colaboradores trataron células L5178Y (designadas por Clive como $TK^{+/+}$ -3) con sulfonato de etilmetanoy aislaron un clon $TK^{-/-}$ (designado como $TK^{-/-}$ -3.7) utilizando bromodesoxiuridina como agente selectivo. A partir del clon $TK^{-/-}$ se aislaron un clon $TK^{+/-}$ espontáneo (designado como $TK^{+/-}$ -3.7.2.) y un subclón (designado como $TK^{+/-}$-3.7.2), que se caracterizaron para utilizarse en el ensayo MLA (27). Se ha publicado el cariotipo de la línea celular (28) (29) (30) (31). El número modal de cromosomas es 40. Hay un cromosoma metacéntrico (t12;13) que debe contarse como un solo cromosoma. El locus *TK* del ratón se encuentra en el extremo distal del cromosoma 11. La línea celular L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C tiene mutaciones en los dos alelos p53 y produce proteína p53 mutante (32) (33). Es probable que la situación de la línea celular $TK^{+/-}$-3.7.2C en cuanto a la proteína p53 sea responsable de la capacidad del ensayo para detectar lesones a gran escala (17).

14. En cuanto al ensayo TK6: TK6 es una línea celular linfoblastoide humana. La línea celular original es una línea celular transformada con virus de Epstein-Barr, WI-L2, que inicialmente se obtuvo de un varón de 5 años con esferocitosis hereditaria. El primer clon aislado, el HH4, fue sometido a tratamiento mutagénico con CIR191 y se generó una línea celular *TK* heterocigótica, la TK6 (34). Las células TK6 son casi diploides y el cariotipo representativo es 47, XY, 13 +, t(14; 20), t(3; 21) (35). El locus *TK* del hombre se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17. La línea celular TK6 es competente respecto a p53 porque tiene una secuencia p53 de tipo natural en ambos alelos y expresa únicamente la proteína p53 de tipo natural (36).

▼M8

15. Tanto en el ensayo MLA como en el TK6, cuando se establezca por primera vez o se reponga un cultivo madre, es aconsejable que el laboratorio de ensayo garantice la ausencia de contaminación por *Mycoplasma*, establezca el cariotipo de las células o marque los cromosomas que albergan el locus *TK*, y compruebe los tiempos de duplicación de la población. Debe determinarse la duración del ciclo celular normal de las células utilizadas en el laboratorio de ensayo, la cual debe ser coherente con las características celulares publicadas (16) (19) (37). Este cultivo madre debe conservarse a una temperatura igual o inferior a -150 °C y utilizarse para preparar todos los cultivos celulares de trabajo.

16. Antes de establecer un gran número de cultivos de trabajo crioconservados o justo antes de su utilización en un experimento, puede ser necesario suprimir de los cultivos las células mutantes preexistentes [a menos que la frecuencia de los mutantes (FM) del control del disolvente esté ya dentro del intervalo aceptable (véase el cuadro 2 en relación con el MLA)]. Esto se consigue utilizando metotrexato (aminopterina) para excluir las células deficientes en cuanto al TK y añadiendo timidina, hipoxantina y glicina (L5178Y) o 2'-desoxicitidina (TK6) al cultivo para garantizar un crecimiento óptimo de las células competentes en cuanto al TK (19) (38) (39), y (40) respecto a las células TK6. En las referencias (19) (31) (37) (39) (41) se ofrece asesoramiento general sobre buenas prácticas para el mantenimiento de los cultivos celulares, así como asesoramiento específico sobre las células L5178Y y TK6. Para los laboratorios que necesiten cultivos celulares madre para iniciar el ensayo MLA o el TK6, o bien para obtener nuevos cultivos celulares madre, se dispone de un depósito celular de células bien caracterizadas (37).

**Medios y condiciones de cultivo**

17. En ambos ensayos, para el mantenimiento de los cultivos deben utilizarse medios de cultivo y condiciones de incubación adecuados (es decir, recipientes de cultivo, atmósfera humidificada con 5 % de $CO_2$, y temperatura de incubación de 37 °C). Los cultivos celulares deben mantenerse siempre en condiciones que garanticen que se encuentran en la fase logarítmica de crecimiento. Es especialmente importante elegir medios y condiciones de cultivo que garanticen un crecimiento celular óptimo durante el período de expresión y clonación de las células, tanto mutantes como no mutantes. En los ensayos MLA y TK6, también es importante que las condiciones de cultivo aseguren un crecimiento óptimo de los mutantes TK tanto de colonias grandes / aparición temprana como de colonias pequeñas / aparición tardía. En (19) (31) (38) (39) (40) (42) se pueden encontrar más precisiones sobre los cultivos, incluida la necesidad de calentar convenientemente el suero de caballo para inactivarlo, si se utiliza el medio RPMI durante la selección de mutantes.

**Preparación de los cultivos**

18. Las células se propagan a partir de cultivos madre, y se siembran en medio de cultivo a una densidad tal que los cultivos en suspensión sigan creciendo exponencialmente a lo largo de los períodos de tratamiento y de expresión.

**Activación metabólica**

19. Se debe recurrir a sistemas exógenos de metabolización cuando se utilicen células L5178Y y TK6 porque su capacidad metabólica endógena es inadecuada. El sistema utilizado con más frecuencia que se recomienda por defecto, salvo en casos justificados, es una fracción postmitocondrial (S9) a la que se añaden cofactores y que se obtiene a partir del hígado de roedores (generalmente ratas) tratados con inductores enzimáticos como el aroclor 1254 (43) (44) (45) o una combinación de fenobarbital y β-naftoflavona (46) (47) (48) (49) (50) (51). Esta última combinación no infringe el Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes(52), y se ha visto que es tan efectiva como el aroclor 1254 para inducir oxidasas de función mixta (45) (46) (47) (48) (49). La fracción S9 se utiliza normalmente

▼M8

a concentraciones que varían entre el 1 y el 2 %, pero que pueden aumentarse hasta el 10 % (v/v) en el medio de ensayo final. La elección del tipo y de la concentración del sistema exógeno de activación metabólica o del inductor metabólico utilizado puede estar influida por la clase de los productos problema.

**Preparación del producto problema**

20. Los productos problema sólidos deben prepararse en disolventes adecuados y, si es conveniente, diluirse antes de tratar las células (véase el punto 21). Los productos problema líquidos pueden añadirse directamente al sistema de ensayo o diluirse antes del tratamiento del sistema de ensayo. Los productos problema gaseosos o volátiles deben someterse a ensayo aplicando modificaciones adecuadas a los protocolos normales, tales como el tratamiento en recipientes de cultivo sellados (53) (54) (55). La preparación del producto problema debe hacerse justo antes del tratamiento, salvo que se cuente con datos de estabilidad que avalen la posibilidad de su conservación.

CONDICIONES DE ENSAYO

**Disolventes**

21. El disolvente debe elegirse para optimizar la solubilidad del producto problema sin tener un impacto negativo en la realización del ensayo, por ejemplo por cambiar el crecimiento celular, afectar a la integridad del producto problema, reaccionar con los recipientes de cultivo, o interferir con el sistema de activación metabólica. Siempre que sea posible, se recomienda considerar en primer lugar la utilización de un disolvente (o medio de cultivo) acuoso. Son disolventes bien establecidos el agua o el dimetilsulfóxido. En general, los disolventes orgánicos no deben exceder del 1 % (v/v) y los disolventes acuosos (solución salina o agua) no deben superar el 10 % (v/v) en el medio de tratamiento final. Si se utilizan disolventes distintos de los que están bien establecidos (por ejemplo, etanol o acetona), debe disponerse de datos justificativos que indiquen su compatibilidad con el sistema de ensayo y los productos problema, y su ausencia de toxicidad genética a la concentración utilizada. En ausencia de estos datos justificativos, es importante utilizar testigos sin tratar (véanse las definiciones en el apéndice 1) para demostrar que el disolvente elegido no es nocivo ni induce efectos mutagénicos.

MEDICIÓN DE LA CITOTOXICIDAD Y SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE TRATAMIENTO

22. Al determinar la concentración máxima de producto problema, debe evitarse llegar a concentraciones que puedan producir respuestas positivas que sean artefactos, tales como las que provocan una citotoxicidad excesiva (véase el punto 28), precipitación en el medio de cultivo (véase el punto 29), o cambios marcados del pH o de la osmolalidad (véase el punto 8). Si el producto problema provoca un cambio marcado en el pH del medio en el momento de su adición, el pH puede ajustarse amortiguando el medio de tratamiento final para evitar resultados positivos que sean artefactos y mantener unas condiciones de cultivo adecuadas.

23. La selección de las concentraciones se basa en la citotoxicidad y en otras consideraciones (véanse los puntos 27-30). Si bien la evaluación de la citotoxicidad en un ensayo inicial puede ser útil para definir mejor las concentraciones que deben utilizarse en el experimento principal, no es obligatorio efectuar ese ensayo inicial. Incluso aunque se realice una evaluación inicial de la citotoxicidad, sigue siendo necesario medir la citotoxicidad en cada cultivo del experimento principal. Si se lleva a cabo un experimento de determinación del intervalo, debe abarcar un amplio intervalo de concentraciones y puede finalizarse el día 1 después del tratamiento o prolongarse durante los dos días de la expresión y hasta la selección de mutantes (si se ve que las concentraciones utilizadas son las adecuadas).

▼**M8**

24. La citotoxicidad se debe determinar en relación con cada cultivo de ensayo y con cada cultivo testigo: los métodos del ensayo MLA (2) y del TK6 (15) están definidos por prácticas acordadas a nivel internacional.

25. En relación con las versiones del MLA tanto en agar como en micropocillos: la citotoxicidad debe evaluarse utilizando el crecimiento relativo total (CRT), definido originalmente por Clive y Spector en 1975 (2). Esta medida incluye el crecimiento relativo en la suspensión (CRS: cultivo de ensayo frente al control del disolvente) durante el tratamiento celular, el tiempo de expresión y la eficacia relativa de clonación (ERC: cultivo de ensayo frente al control del disolvente) en el momento en que se seleccionan los mutantes (2). Cabe señalar que el CRS incluye cualquier pérdida de células que se produzca en el cultivo de ensayo durante el tratamiento (véanse las fórmulas en el apéndice 2).

26. En cuanto al ensayo TK6: la citotoxicidad debe evaluarse utilizando la supervivencia relativa (SR), es decir, la eficiencia de clonación de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta las eventuales pérdidas de células durante el tratamiento, sobre la base del recuento celular, frente a la del testigo negativo (al que se asigna una supervivencia del 100 %) (véase la fórmula en el apéndice 2).

27. Deben evaluarse al menos cuatro concentraciones de ensayo (sin incluir el testigo positivo ni el control del disolvente) que cumplan los criterios de aceptabilidad (citotoxicidad apropiada, número de células, etc.). Si bien es aconsejable utilizar cultivos duplicados, a cada concentración estudiada podrán utilizarse cultivos tratados bien replicados o bien únicos. Los resultados obtenidos en los cultivos replicados a una concentración determinada deben comunicarse por separado, pero pueden agruparse para el análisis de datos (55). En el caso de productos problema que muestren escasa o nula citotoxicidad, normalmente serán adecuados los intervalos de concentración de aproximadamente el doble o el triple. Cuando se produce citotoxicidad, deben seleccionarse las concentraciones de ensayo para cubrir el intervalo de citotoxicidad a partir de la concentración que provoca citotoxicidad según se describe en el punto 28, con inclusión en particular de las concentraciones a las que existe citotoxicidad moderada y débil o nula. Muchos productos problema presentan curvas concentración-respuesta de elevada pendiente y, a fin de abarcar toda la gama de citotoxicidad o de estudiar la relación concentración-respuesta en detalle, puede ser necesario utilizar concentraciones más próximas entre sí y en un número superior a cuatro, en particular en situaciones en las que se requiera repetir un experimento (véase el punto 70). La utilización de más de cuatro concentraciones puede ser especialmente importante si se utilizan cultivos únicos.

28. Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, la concentración más alta debe aspirar a proporcionar entre el 20 y el 10 % de CRT en el caso del MGA, y entre el 20 y el 10 % de SR en el caso del TK6 (punto 67).

29. Con productos problema poco solubles que no son citotóxicos a concentraciones inferiores a la concentración mínima insoluble, la mayor concentración analizada debe producir turbidez o precipitado visibles a simple vista o con ayuda de un microscopio invertido al final del tratamiento con el producto problema. Incluso si se produce citotoxicidad por encima del límite de solubilidad, es aconsejable hacer el ensayo a una única concentración que produzca turbidez o precipitado visible porque este puede provocar efectos falsos. Dado que los ensayos MLA y TK6 utilizan cultivos en suspensión, hay que tener especial cuidado para que el precipitado no interfiera con la realización del ensayo. Puede ser útil también determinar la solubilidad en el medio de cultivo antes de efectuar el experimento.

▼M8

30. Si no se observa precipitado ni citotoxicidad limitante, la concentración de ensayo más elevada debe corresponder a la más baja de las siguientes: 10 mM, 2 mg/ml o 2 µl/ml (57) (58). Cuando el producto problema no tenga una composición definida y se trate, p. ej., de una sustancia de composición desconocida o variable, de productos complejos de reacción o de materiales biológicos [es decir, sustancias de composición desconocida o variable (UVCB)], extractos medioambientales, etc., es posible que la concentración superior tenga que ser mayor (p. ej., 5 mg/ml), en ausencia de citotoxicidad suficiente, para aumentar la concentración de cada uno de los componentes. Conviene señalar, no obstante, que estos requisitos pueden variar en caso de medicamentos de uso humano (59).

**Testigos**

31. Se deben incluir, con cada condición experimental, testigos negativos en paralelo (véase el punto 21), consistentes en el disolvente solo en el medio de tratamiento y manipulados de la misma manera que los cultivos tratados.

32. Es necesario disponer de testigos positivos en paralelo a fin de demostrar la capacidad del laboratorio para detectar mutágenos en las condiciones establecidas en el protocolo de ensayo utilizado, la efectividad del sistema exógeno de activación metabólica (si procede), y la detección adecuada de los mutantes *TK* tanto grandes / de aparición temprana como pequeños / de aparición tardía. En el cuadro 1 a continuación se encuentran ejemplos de testigos positivos. Es posible utilizar como testigos positivos otras sustancias, si se justifica. Debido a que los ensayos de toxicidad genética con células de mamífero *in vitro* están suficientemente normalizados respecto a los tratamientos a corto plazo (3-4 horas) realizados en paralelo, con y sin activación metabólica, utilizando la misma duración del tratamiento, el uso de testigos positivos puede limitarse a un mutágeno que requiera activación metabólica. En este caso, una respuesta de este único testigo positivo demostrará tanto la actividad del sistema de activación metabólica como la sensibilidad del sistema de ensayo. Si se utilizan, los tratamientos a largo plazo (es decir, 24 horas sin fracción S9) deben tener, no obstante, su propio testigo positivo, ya que la duración del tratamiento será diferente de la del ensayo con activación metabólica. Cada testigo positivo debe utilizarse a una o varias concentraciones de las que se espere que den un aumento reproducible y detectable respecto al nivel de fondo, a fin de demostrar la sensibilidad del sistema de ensayo, y la respuesta no debe ponerse en peligro por una citotoxicidad que supere los límites especificados en el presente método de ensayo (véase el punto 28).

*Cuadro 1*

**Sustancias de referencia recomendadas para evaluar la competencia del laboratorio, y para la selección de los testigos positivos**

| Categoría | Sustancia | N.º CAS |
|---|---|---|
| 1. Mutágenos activos sin activación metabólica | | |
| | Metanosulfonato de metilo | 66-27-3 |
| | Mitomicina C | 50-07-7 |
| | N-Óxido de 4-nitroquinolina | 56-57-5 |
| 2. Mutágenos que necesitan activación metabólica | | |
| | Benzo(a)pireno | 50-32-8 |
| | Ciclofosfamida (monohidrato) | 50-18-0 (6055-19-2) |
| | 7,12-Dimetilbenzoantraceno | 57-97-6 |
| | 3-Metilcolantreno | 56-49-5 |

▼M8

PROCEDIMIENTO

**Tratamiento con el producto problema**

33. Se tratan células en crecimiento con el producto problema en presencia y en ausencia de un sistema de activación metabólica. La exposición debe durar un plazo de tiempo adecuado (generalmente de 3 a 4 horas). Conviene señalar, no obstante, que estos requisitos pueden variar en caso de medicamentos de uso humano (59). En relación con el ensayo MLA, en los casos en que el tratamiento a corto plazo dé resultados negativos, y se disponga de información que sugiera la necesidad de un tratamiento más prolongado [por ejemplo, análogos de nucleósidos, productos poco solubles (5) (59)], debe prestarse atención a la realización del ensayo con un tratamiento más largo, es decir, 24 horas sin S9.

34. El número mínimo de células utilizadas para cada cultivo del ensayo (testigo y tratado) en cada fase del ensayo debe basarse en la frecuencia de mutantes espontáneos. Una orientación general consiste en tratar y resembrar suficientes células de cada cultivo experimental de forma que se mantengan al menos 10 mutaciones espontáneas, aunque lo ideal es que sean 100, en todas las fases del ensayo (tratamiento, expresión fenotípica y selección de mutantes) (56).

35. Para el ensayo MLA, la frecuencia de mutantes espontáneos aceptable recomendada se sitúa entre 35 y 140 × $10^{-6}$ (versión en agar) y entre 50 y 170 × $10^{-6}$ (versión en micropocillos) (véase el cuadro 2). Para tener como mínimo 10, e idealmente 100, mutantes espontáneos que sobrevivan al tratamiento en cada cultivo de ensayo, es necesario tratar al menos 6 × $10^{6}$ células. El tratamiento de este número de células, y el mantenimiento de células suficientes durante la expresión y la clonación para la selección de mutantes, proporciona un número suficiente de mutantes espontáneos (10 o más) en todas las fases del experimento, incluso en el caso de los cultivos tratados con concentraciones que dan lugar a una citotoxicidad del 90 % (medida por un CRT del 10 %) (19) (38) (39).

36. En el caso del ensayo TK6, la frecuencia de mutantes espontáneos suele estar entre 2 y 10 × $10^{-6}$. Para tener como mínimo 10 mutantes espontáneos que sobrevivan al tratamiento en cada cultivo, es necesario tratar al menos 20 × $10^{6}$ células. El tratamiento de este número de células ofrece un número suficiente de mutaciones espontáneas (10 o más), incluso en el caso de los cultivos tratados con concentraciones que provocan una citotoxicidad del 90 % durante el tratamiento (10 % de SR). Además, ha de disponerse de un número suficiente de células para cultivarlas durante el período de expresión y para sembrarlas a efectos de la selección de mutantes (60).

**Período de expresión fenotípica y medición de la citotoxicidad y de la frecuencia de mutantes**

37. Al final del período de tratamiento, las células se cultivan durante un tiempo determinado para permitir una expresión fenotípica casi óptima de los mutantes recién inducidos; este tiempo es específico de cada línea celular. En el ensayo MLA, el período de expresión fenotípica es de 2 días. En el ensayo TK6, el período de expresión fenotípica es de 3-4 días. Si se utiliza un tratamiento de 24 horas, el período de expresión comienza una vez finalizado el tratamiento.

38. Durante el período de expresión fenotípica, las células se enumeran diariamente. En el caso del MLA se utilizan los recuentos celulares diarios para calcular el crecimiento diario en la suspensión (CS). Tras el período de expresión de 2 días, las células se suspenden en medio con y sin agente selectivo para determinar el número de mutantes (placas de selección) y la eficiencia de clonación (placas de viabilidad), respectivamente. En el caso del ensayo MLA, existen dos métodos igualmente aceptables para la clonación de la selección de mutantes; uno con agar blando y el otro con medio líquido en placas de 96 pocillos (19) (38) (39). La clonación en el ensayo TK6 se realiza utilizando medios líquidos y placas de 96 pocillos (16).

▼M8

39. La trifluorotimidina (TFT) es el único agente selectivo recomendado para los mutantes *TK* (61).

40. En el MLA, las placas de agar y las placas de micropocillos se cuentan después de 10-12 días de incubación. En el TK6, las colonias de las placas de micropocillos se examinan después de 10 o 14 días en cuanto a la presencia de mutantes de aparición temprana. Con el fin de recuperar los mutantes TK6 de crecimiento lento (aparición tardía), es necesario volver a aportar a las células medio de cultivo y TFT después de haber recontado los mutantes de aparición temprana y, a continuación, incubar las placas durante un período adicional de 7-10 días (62). Véase en los puntos 42 y 44 una discusión del recuento de los mutantes *TK* de crecimiento lento y normal.

41. Los cálculos apropiados para los dos ensayos, incluidos los dos métodos (agar y micropocillos) del ensayo MLA, figuran en el apéndice 2. En el método con agar del MLA, se recuentan las colonias y se ajusta el número de colonias mutantes en función de la eficiencia de clonación para calcular la FM. En la versión con micropocillos del MLA y en el TK6, la eficiencia de clonación en las placas tanto de selección como de eficiencia de clonación se determina con arreglo a la distribución de Poisson (63). La FM se calcula a partir de estas dos eficiencias de clonación.

**Caracterización de las colonias de mutantes**

42. En el caso del MLA, si el producto problema es positivo (véanse los puntos 62-63), debe realizarse la caracterización de las colonias en función de su tamaño o crecimiento al menos en uno de los cultivos de ensayo (en general, a la concentración positiva más alta aceptable) y en los testigos positivos y negativos. Si el producto problema es negativo (véase el punto 64), debe procederse a la caracterización de las colonias de mutantes en los testigos positivos y negativos. En el método de micropocillos del MLA se definen los mutantes de colonias pequeñas como aquellos que cubren menos del 25 % del diámetro del pocillo y los mutantes de colonias grandes como los que cubren más del 25 % del diámetro del pocillo. En el caso del método de agar, se utiliza un contador automático de colonias para enumerar las colonias mutantes y para determinar su tamaño. En la bibliografía se detallan los enfoques relativos al tamaño de las colonias (19) (38) (40). La caracterización de las colonias en los testigos positivos y negativos es necesaria para demostrar que los estudios se llevan a cabo adecuadamente.

43. No puede determinarse que el producto problema sea negativo si no se detectan adecuadamente en el testigo positivo tanto las colonias grandes como las pequeñas. La caracterización de las colonias puede utilizarse para proporcionar información general sobre la capacidad del producto problema para causar mutaciones puntuales o fenómenos cromosómicos (punto 4).

44. TK6: los mutantes de crecimiento normal y los de crecimiento lento se diferencian por una variación en el tiempo de incubación (véase el punto 40). En el caso del TK6, en general los mutantes de aparición temprana y tardía se puntúan en relación con todos los cultivos, incluidos los testigos positivos y negativos. La caracterización de las colonias en los testigos positivos y negativos es necesaria para demostrar que los estudios se llevan a cabo adecuadamente. No puede determinarse que el producto problema sea negativo si no se detectan adecuadamente en el testigo positivo tanto los mutantes de aparición temprana como los mutantes de aparición tardía. La caracterización de las colonias puede utilizarse para proporcionar información general sobre la capacidad del producto problema para causar mutaciones puntuales o fenómenos cromosómicos (punto 4).

▼M8

**Competencia del laboratorio**

45. Con el fin de demostrar la suficiente experiencia con el ensayo antes de utilizarlo para los ensayos sistemáticos, el laboratorio debe haber efectuado una serie de experimentos con sustancias positivas de referencia que actúen a través de mecanismos diferentes (como mínimo, una activa con activación metabólica y otra activa sin ella, seleccionadas de entre las sustancias enumeradas en el cuadro 1) y con diversos testigos negativos (incluyendo cultivos sin tratar y diferentes disolventes o vehículos). Las respuestas obtenidas con estos testigos positivos y negativos deben ser coherentes con la bibliografía. Este requisito no es aplicable a los laboratorios que tienen experiencia, esto es, que disponen de una base de datos históricos, según se define en los puntos 47-50. En el caso del ensayo MLA, los valores obtenidos con los testigos tanto positivos como negativos deben ser coherentes con las recomendaciones del IWGT (véase el cuadro 2).

46. Debe investigarse una selección de sustancias testigo positivo (véase el cuadro 1) con tratamientos cortos y largos, en ausencia de activación metabólica, y también con tratamientos cortos en presencia de activación metabólica, para demostrar la capacidad de detectar productos mutágenos, para determinar la efectividad del sistema de activación metabólica y para demostrar la adecuación de las condiciones de crecimiento celular durante el tratamiento, la expresión fenotípica y la selección de mutantes, así como la de los procedimientos de examen. Debe elegirse una gama de concentraciones de las sustancias seleccionadas de forma que produzcan aumentos sobre el nivel de fondo relacionados con la concentración y reproducibles, para demostrar la sensibilidad y el intervalo dinámico del sistema de ensayo.

**Datos sobre testigos históricos**

47. El laboratorio debe determinar:

— un intervalo y una distribución de los testigos positivos históricos,

— un intervalo y una distribución de los testigos negativos (sin tratar, disolventes) históricos.

48. Cuando se obtengan datos por primera vez en relación con la distribución de testigos negativos históricos, los testigos negativos en paralelo deben ser coherentes con los datos publicados de los testigos negativos. Según se añadan más datos experimentales sobre la distribución de los testigos, los testigos negativos en paralelo deben situarse idealmente dentro de los límites de control del 95 % de dicha distribución (64) (65).

49. La base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio debe constituirse en un principio con un mínimo de 10 experimentos, pero preferiblemente con al menos 20 experimentos realizados en condiciones experimentales comparables. Los laboratorios deben utilizar métodos de control de calidad, como gráficos de control [por ejemplo, gráficos C o gráficos de medias (65)], con el fin de determinar la variabilidad de sus datos sobre los testigos positivos y negativos, y de demostrar que la metodología está «controlada» en su laboratorio (66). En la bibliografía se encuentran más datos y recomendaciones sobre cómo conseguir y utilizar los datos históricos (64).

50. Los datos de los testigos negativos deben consistir en frecuencias de mutantes procedentes de cultivos únicos o preferiblemente replicados, tal como se describe en el punto 27. Lo ideal sería que los testigos negativos en paralelo estuvieran dentro de los límites de control del 95 % de la distribución de la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio. Cuando hay datos de los testigos negativos que quedan fuera del límite de control del 95 %, su inclusión en la distribución de testigos históricos puede ser aceptable en la medida en que dichos datos no sean valores atípicos extremos, y haya pruebas de que el sistema de ensayo está «controlado» (véase el punto 49) y de la ausencia de fallos técnicos o humanos.

▼M8

51. Cualquier cambio en el protocolo experimental debe considerarse en función de la coherencia de los datos con las bases de datos de testigos históricos existentes del laboratorio. Cualquier incoherencia importante debería dar lugar a la creación de una nueva base de datos de testigos históricos.

DATOS E INFORME

**Presentación de los resultados**

52. La presentación de los datos correspondientes a los ensayos MLA y TK6 debe incluir, tanto respecto a los cultivos tratados como a los testigos, los datos necesarios para el cálculo de la citotoxicidad (CRT o SR, respectivamente) y las frecuencias de mutantes, según se describe a continuación.

53. En el caso del ensayo MLA, deben facilitarse datos sobre los distintos cultivos en cuanto al CRS, el CRT, la eficiencia de clonación en el momento de la selección de mutantes y el número de colonias mutantes (en la versión con agar) o el número de pocillos vacíos (en la versión con micropocillos). La FM debe expresarse como número de células mutantes por millón de células supervivientes. Si la respuesta es positiva, deben darse las FM de las colonias pequeñas y grandes (y/o el porcentaje de la FM total) al menos a una concentración del producto problema (en general, la mayor concentración positiva) y con los testigos positivos y negativos. En caso de respuesta negativa, debe darse las FM de las colonias pequeñas y grandes en relación con el control negativo y el control positivo.

54. En el ensayo TK6, deben facilitarse datos sobre los distintos cultivos en relación con la SR, la eficiencia de clonación en el momento de la selección de mutantes y el número de pocillos vacíos correspondientes a los mutantes de aparición temprana y a los de aparición tardía. La FM debe expresarse como número de células mutantes por número de células supervivientes, y debe incluir la FM total, así como la FM (y/o el porcentaje de la FM total) de los mutantes de aparición temprana y de aparición tardía.

**Criterios de aceptabilidad**

55. Tanto en el ensayo MLA como en el TK6 deben cumplirse los siguientes criterios antes de determinar los resultados globales correspondientes a un producto problema específico:

— Se han estudiado dos condiciones experimentales (tratamiento corto con y sin activación metabólica, véase el punto 33), salvo que se hayan obtenido resultados positivos en una de ellas.

— Son analizables números y concentraciones apropiados de células (véanse los puntos 27 y 34-36).

— Los criterios de selección de la concentración superior son coherentes con los descritos en los puntos 28-30.

*Criterios de aceptabilidad de los testigos positivos y negativos*

56. El análisis, realizado por el grupo de trabajo de expertos MLA del IWGT, de una amplia cantidad de datos del MLA dio lugar a un consenso internacional en torno a los criterios de aceptabilidad específicos del MLA (1) (2) (3) (4) (5). Por lo tanto, este método de ensayo ofrece recomendaciones específicas para determinar la aceptabilidad de los testigos negativos y positivos y para evaluar los resultados de distintas sustancias con el ensayo MLA. El TK6 tiene una base de datos mucho más pequeña y no ha sido objeto de evaluación por parte de un grupo de trabajo.

▼M8

57. En el caso del ensayo MLA, se debe evaluar cada experimento para determinar si el testigo sin tratar / control del disolvente cumple los criterios de aceptación del grupo de trabajo de expertos MLA del IWGT [(4) y cuadro 2, más abajo] en relación con: 1) la FM (obsérvese que las FM aceptables para el IWGT son diferentes para la versión con agar y para la versión con micropocillos del MGA), 2) la eficiencia de clonación (EC) en el momento de la selección de los mutantes, y 3) el crecimiento en la suspensión (CS) del control del disolvente (véanse las fórmulas en el apéndice 2).

*Cuadro 2*

**Criterios de aceptabilidad del MLA**

| Parámetro | Método de agar blando | Método de micropocillos |
|---|---|---|
| Frecuencia de mutantes | 35 – 140 × $10^{-6}$ | 50 – 170 × $10^{-6}$ |
| Eficiencia de clonación | 65 – 120 % | 65 – 120 % |
| Crecimiento en la suspensión | 8 – 32 veces (tratamiento de 3 a 4 horas)<br>32 – 180 veces (tratamiento de 24 horas, si se lleva a cabo) | 8 – 32 veces (tratamiento de 3 a 4 horas)<br>32 – 180 veces (tratamiento de 24 horas, si se lleva a cabo) |

58. En el caso del ensayo MLA, también debe evaluarse cada ensayo en cuanto a si el testigo o testigos positivos cumplen al menos uno de los dos criterios de aceptación siguientes, elaborados por el grupo de trabajo del IWGT:

— El testigo positivo debe mostrar un aumento absoluto de la FM total, es decir, un aumento por encima de la FM de fondo espontánea [una FM inducida (FMI)], de al menos 300 × $10^{-6}$. Al menos el 40 % de la FMI debe reflejarse en la FM de las colonias pequeñas.

— El testigo positivo tiene un aumento en la FM de las colonias pequeñas de al menos 150 × $10^{-6}$ por encima de la observada en el caso de un testigo sin tratar / control del disolvente (una FMI de las pequeñas colonias de 150 × $10^{-6}$).

59. En el caso del TK6, el ensayo será aceptable si el testigo negativo en paralelo se considera aceptable para añadirse a la base de datos de testigos negativos históricos del laboratorio de acuerdo con lo descrito en los puntos 48-49. Además, los testigos positivos en paralelo (véase el punto 32) deben inducir respuestas compatibles con las obtenidas en la base de datos de testigos positivos históricos y producir un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo.

60. En ambos ensayos, el límite superior de citotoxicidad observado en el cultivo del testigo positivo debe ser el mismo que en los cultivos experimentales. Es decir, el valor de CRT o SR no debe ser inferior al 10 %. Basta con utilizar una sola concentración (o una de las concentraciones de los cultivos de los testigos positivos si se utiliza más de una concentración) para demostrar que se cumplen los criterios de aceptación del testigo positivo. Además, la FM del testigo positivo deberá encontrarse dentro del intervalo aceptable establecido para el laboratorio.

**Evaluación e interpretación de los resultados**

61. En el caso del MLA, el grupo de trabajo de expertos en linfoma de ratón del IWGT ha llevado a cabo un trabajo significativo en relación con la pertinencia biológica y los criterios de respuesta positiva (4). Por lo tanto, este método de ensayo ofrece recomendaciones específicas para la interpretación de los resultados de los productos problema obtenidos con el ensayo MLA

▼M8

(véanse los puntos 62 a 64). El TK6 tiene una base de datos mucho más pequeña y no ha sido objeto de evaluación por parte de un grupo de trabajo. Por lo tanto, las recomendaciones para la interpretación de los datos del TK6 se dan en términos más generales (véanse los puntos 65-66). Se aplican recomendaciones adicionales a ambos ensayos (véanse los puntos 67-71).

*MLA*

62. Se recomienda un planteamiento para definir las respuestas positivas y negativas a fin de garantizar que el aumento de la FM es biológicamente pertinente. En lugar del análisis estadístico utilizado generalmente con otros ensayos, este planteamiento se basa en el uso de una frecuencia de mutantes inducida predefinida (es decir, el aumento de la FM por encima del control en paralelo), designada como factor de evaluación global (FEG), el cual se basa en el análisis de la distribución de los datos de FM de los testigos negativos conseguidos en los laboratorios participantes (4). Para la versión del MLA con agar, el FEG es $90 \times 10^{-6}$, y para la versión del MLA con micropocillos, el FEG es $126 \times 10^{-6}$.

63. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que un producto problema es claramente positivo si, en alguna de las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 33), el aumento de la FM por encima del fondo de referencia en paralelo excede del FEG y el aumento está relacionado con la concentración (por ejemplo, según una prueba de tendencia). El producto problema se considera entonces capaz de inducir mutaciones en este sistema de ensayo.

64. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que un producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 33), no hay ninguna respuesta relacionada con la concentración o, si se produce un aumento de la FM, este no supera el FEG. El producto problema se considera entonces incapaz de inducir mutaciones en este sistema de ensayo.

*TK6*

65. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente positivo si, en alguna de las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 33):

— al menos una de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

— el aumento está relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada (véase el punto 33),

— alguno de estos resultados está fuera de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límite de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 48).

Cuando se cumplen todos estos criterios, el producto problema se considera capaz de inducir mutaciones en este sistema de ensayo. En la bibliografía se encuentran recomendaciones sobre los métodos estadísticos más adecuados (66) (67).

66. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es claramente negativo si, en todas las condiciones experimentales examinadas (véase el punto 33):

— ninguna de las concentraciones de ensayo muestra un aumento estadísticamente significativo en comparación con el testigo negativo en paralelo,

— no hay ningún aumento relacionado con la concentración cuando se evalúa con una prueba de tendencia adecuada,

▼M8

— todos los resultados están dentro de la distribución de los datos históricos de los testigos negativos (por ejemplo, límite de control del 95 % según la distribución de Poisson; véase el punto 48).

El producto problema se considera entonces incapaz de inducir mutaciones en este sistema de ensayo.

*Tanto con MLA como con TK6:*

67. Si la concentración máxima se basa en la citotoxicidad, la concentración más elevada debe intentar conseguir un valor de CRT o SR entre el 20 y el 10 %. Hay consenso en cuanto a la necesidad de tener cuidado a la hora de interpretar los resultados positivos que solo se encuentren entre el 20 y el 10 % de CRT/SR, y en cuanto a no considerar positivo un resultado si el aumento de la FM se produce solo a un valor inferior o igual al 10 % de CRT/SR (si se evalúa) (2) (59).

68. Hay algunas circunstancias en las que cierta información adicional puede ayudar a determinar que un producto problema no es mutágeno cuando no existe ningún cultivo que muestre un valor de CRT entre el 10 y el 20 % de CRT/SR. Estas situaciones se exponen a continuación: 1) No hay pruebas de mutagenicidad (por ejemplo, no hay respuesta en función de las dosis, no hay ninguna frecuencia de mutantes por encima de las registradas con los testigos negativos en paralelo o en los intervalos de fondo históricos, etc.) en una serie de puntos de datos de entre el 100 % y el 20 % de CRT/SR y hay por lo menos un punto de datos entre el 20 y el 25 % de CRT/SR. 2) No hay pruebas de mutagenicidad (por ejemplo, no hay respuesta en función de las dosis, no hay ninguna frecuencia de mutantes por encima de las registradas con los testigos negativos en paralelo o en los intervalos de fondo históricos, etc.) en una serie de puntos de datos de entre el 100 % y el 25 % de CRT/SR y hay también un punto de datos negativo ligeramente por debajo del 10 % de CRT/SR. En ambas situaciones puede concluirse que el producto problema es negativo.

69. No se requiere ninguna verificación de una respuesta claramente positiva o negativa.

70. En los casos en que la respuesta no sea ni claramente positiva ni claramente negativa como se describe más arriba, o a fin de ayudar a determinar la relevancia biológica de un resultado, los datos deben ser evaluados por expertos o mediante más investigaciones. Puede ser útil repetir el experimento modificando quizás las condiciones experimentales [por ejemplo, la separación entre concentraciones para aumentar la probabilidad de alcanzar puntos de datos dentro del intervalo del 10-20 % de CRT/SR, las condiciones de activación metabólica (por ejemplo, la concentración o el origen de la fracción S9) y la duración del tratamiento].

71. En casos raros, incluso después de hacer más investigaciones, el conjunto de datos no permite que se extraiga una conclusión de resultado positivo o negativo. Por lo tanto, debe concluirse que la respuesta del producto problema es dudosa (lo que se interpreta como que resulta igualmente probable que sea positiva o negativa).

INFORME DEL ENSAYO

72. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se conocen;

— estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

▼**M8**

— medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancias de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Disolvente:*

— justificación de la elección del disolvente;

— porcentaje de disolvente en el medio de cultivo final.

*Células:*

En el caso de cultivos madre de laboratorio:

— tipo y origen de las células, e historia en el laboratorio de ensayo;

— características del cariotipo y/o número modal de los cromosomas;

— métodos de mantenimiento de los cultivos celulares;

— ausencia de micoplasmas;

— tiempos de duplicación de las células.

*Condiciones del ensayo:*

— fundamento de la selección de las concentraciones y del número de los cultivos celulares; incluidos, por ejemplo, datos relativos a la citotoxicidad y limitaciones de solubilidad;

— composición de los medios, concentración de $CO_2$ , nivel de humedad;

— concentración del producto problema, expresada como concentración final en el medio de cultivo (por ejemplo, mM, o µg o mg/ml de medio de cultivo);

— concentración (y/o volumen) del disolvente y del producto problema añadidos al medio de cultivo;

— temperatura de incubación;

— tiempo de incubación;

— duración del tratamiento;

— densidad celular durante el tratamiento;

▼**M8**

— tipo y composición del sistema de activación metabólica (origen de la fracción S9, método de preparación de la mezcla S9, concentración o volumen de la mezcla S9 y de la fracción S9 en el medio de cultivo final, controles de calidad de la fracción S9);

— sustancias testigo positivo y negativo, concentraciones finales en cada una de las condiciones de tratamiento;

— duración del período de expresión (con el número de células sembradas, subcultivos y pautas de nutrición, si procede);

— identidad del agente selectivo y su concentración;

— para el ensayo MLA debe indicarse la versión utilizada (agar o micropocillos);

— criterios de aceptabilidad de los estudios;

— métodos empleados para contar las células viables y las mutantes;

— métodos utilizados para medir la citotoxicidad;

— cualquier información adicional relativa a la citotoxicidad y método utilizado;

— duración de la incubación después de la siembra;

— definición de las colonias de las que se considera el tamaño y el tipo (incluidos, en su caso, los criterios de distinción de colonias «grandes» y «pequeñas»);

— criterios empleados para considerar si los resultados de los estudios son positivos, negativos o dudosos;

— métodos utilizados para determinar el pH y la osmolalidad, si se aplican, y la precipitación si es pertinente.

*Resultados:*

— número de células tratadas y número de células subcultivadas por cada cultivo;

— parámetros de toxicidad (CRT con el MLA y SR con el TK6);

— signos de precipitación y momento de la determinación;

— número de células sembradas en medio selectivo y no selectivo;

— número de colonias en medio no selectivo y número de colonias resistentes en medio selectivo, y frecuencias de mutantes correspondientes;

— determinación del tamaño de las colonias de los testigos positivos y negativos y si el producto problema es positivo, al menos a una concentración, y las frecuencias de mutantes correspondientes;

— relación concentración-respuesta, cuando sea posible;

— datos de los testigos negativos (disolvente) y positivos (concentraciones y disolventes) en paralelo;

— datos de los testigos negativos (disolvente) y positivos (concentraciones y disolventes) históricos, con intervalos, medias y desviaciones típicas; número de ensayos en los que se basan los controles históricos;

▼M8

— análisis estadísticos (correspondientes a los cultivos individuales y a las réplicas combinadas, en su caso), y valores p, en su caso; y, en relación con el MLA, la evaluación del FEG.

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Moore, M.M., Honma, M. Clements, J. (Rapporteur), Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cole, J., Gollapudi, B., Harrington-Brock, K., Mitchell, A., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2000). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus (TK) Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP) Workgroup Report, Environ. Mol. Mutagen., 35 (3): 185-190.

(2) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Harrington-Brock, K., Awogi, T., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Collard, D., Fellows, M., Flanders, K., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Kraycer, J., McEnaney, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Shimada, H. and Stankowski, L.F. Jr. (2002). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: Follow-Up International Workshop on Genotoxicity Test Procedures, New Orleans, Louisiana, (April 2000), Environ. Mol. Mutagen., 40 (4): 292-299.

(3) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Ouldelhkim, M-C., Pant, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2003). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Locus Gene Mutation Assay: International Workshop (Plymouth, UK) on Genotoxicity Test Procedures Workgroup Report, Mutation Res., 540: 127-140.

(4) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Delongchamp, R., Durward, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Lloyd, M., Majeska, J., Myhr, B., O'Donovan, M., Omori, T., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F. Jr., Thakur, A.K., Van Goethem, F., Wakuri, S. and Yoshimura, I. (2006). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-Up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Tests – Aberdeen, Scotland, 2003 – Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation, Environ. Mol. Mutagen., 47 (1): 1-5.

(5) Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Burlinson, B., Cifone, M., Clarke, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, P., Muster, W., Pant, K., Kidd, D.A., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, L.F. Jr., Thakur A.K. and Van Goethem, F. (2007). Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Mutation Assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, Recommendations for 24-h Treatment, Mutation. Res., 627 (1): 36-40.

(6) OCDE (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. ENV Publications. Series on Testing and Assessment, No 234, OECD, Paris.

(7) Fellows M.D., Luker, T., Cooper, A. and O'Donovan, M.R. (2012). Unusual Structure-Genotoxicity Relationship in Mouse Lymphoma Cells Observed with a Series of Kinase Inhibitors. Mutation, Res., 746 (1): 21-28.

(8) Honma, M., Momose, M., Sakamoto, H., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2001). Spindol Poisons Induce Allelic Loss in Mouse Lymphoma Cells Through Mitotic Non-Disjunction. Mutation Res., 493 (1-2): 101-114.

▼**M8**

(9) Wang, J., Sawyer, J.R., Chen, L., Chen, T., Honma, M., Mei, N. and Moore, M.M. (2009). The Mouse Lymphoma Assay Detects Recombination, Deletion, and Aneuploidy, *Toxicol*. Sci., 109 (1): 96-105.

(10) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A., and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. National. Academy. Sci. USA, 87 (1): 51-55.

(11) Hozier, J., Sawyer, J., Moore, M., Howard, B. and Clive, D. (1981). Cytogenetic Analysis of the L5178Y/$TK^{+/-}$ Leads to $TK^{-/-}$ Mouse Lymphoma Mutagenesis Assay System, Mutation Res., 84 (1): 169-181.

(12) Hozier, J., Sawyer, J., Clive, D. and Moore, M.M. (1985). Chromosome 11 Aberrations in Small Colony L5178Y $TK^{-/-}$ Mutants Early in their Clonal History, Mutation Res., 147 (5): 237-242.

(13) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C., Howard, B.E., Batson, A.G., Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine-Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151 (1): 161-174.

(14) Liber H.L., Call K.M. and Little J.B. (1987). Molecular and Biochemical Analyses of Spontaneous and X-Ray-Induced Mutants in Human Lymphoblastoid Cells. Mutation Res., 178 (1): 143-153.

(15) Li C.Y., Yandell D.W. and Little J.B. (1992). Molecular Mechanisms of Spontaneous and Induced Loss of Heterozygosity in Human Cells *In Vitro*. Somat. Cell Mol. Genet., 18 (1): 77-87.

(16) Honma M., Hayashi M. and Sofuni T. (1997). Cytotoxic and Mutagenic Responses to X-Rays and Chemical Mutagens in Normal and P53-Mutated Human Lymphoblastoid Cells. Mutation. Res., 374 (1): 89-98.

(17) Honma, M., Momose, M., Tanabe, H., Sakamoto, H., Yu, Y., Little, J.B., Sofuni, T. and Hayashi, M. (2000). Requirement of Wild-Type P53 Protein for Maintenance of Chromosomal Integrity. Mol. Carcinogen., 28 (4): 203-14.

(18) Amundson S.A. and Liber H.L. (1992). A Comparison of Induced Mutation at Homologous Alleles of the TK Locus in Human Cells. II. Molecular Analysis of Mutants. Mutation Res., 267 (1): 89-95.

(19) Schisler M.R., Moore M.M. and Gollapudi B.B. (2013). *In Vitro* Mouse Lymphoma (L5178Y $TK^{+/-}$ -3.7.2C) Forward Mutation Assay. In Protocols in Genotoxicity Assessment A. Dhawan and M. Bajpayee (Eds.), Springer Protocols, Humana Press: 27-50.

(20) Long, L.H., Kirkland, D., Whitwell, J. and Halliwell, B. (2007). Different Cytotoxic and Clastogenic Effects of Epigallocatechin Gallate in Various Cell-Culture Media Due to Variable Rates of its Oxidation in the Culture Medium, Mutation Res., 634 (1-2): 177-183.

(21) Nesslany, F., Simar-Meintieres, S., Watzinger, M., Talahari, I. and Marzin, D. (2008). Characterization of the Genotoxicity of Nitrilotriacetic Acid. Environ. Mol. Mutagen., 49 (6): 439-452.

(22) Brusick D. (1986). Genotoxic Effects in Cultured Mammalian Cells Produced by Low pH Treatment Conditions and Increased Ion Concentrations. Environ. Mutagen., 8 (6): 879-886.

(23) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992). Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells. Mutation Res., 268 (2): 297-305.

▼**M8**

(24) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, R.R., Ishidate, M.Jr, Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257: 147-204.

(25) Wang J., Heflich R.H. and Moore M.M. (2007). A Method to Distinguish Between the *De Novo* Induction of Thymidine Kinase Mutants and the Selection of Pre-Existing Thymidine Kinase Mutants in the Mouse Lymphoma Assay. Mutation Res., 626 (1-2): 185-190.

(26) Fischer, G.A. (1958). Studies on the Culture of Leukemic Cells *In Vitro*. Ann. N.Y. Academy Sci., 76: 673-680.

(27) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown, M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutation Res., 59(1): 61-108.

(28) Sawyer, J., Moore, M.M., Clive, D. and Hozier, J. (1985). Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 147 (5): 243-253.

(29) Sawyer J.R., Moore M.M. and Hozier J.C. (1989). High-Resolution Cytogenetic Characterization of the L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Line, Mutation Res., 214 (2): 181-193.

(30) Sawyer, J.R., Binz, R.L., Wang, J. and Moore, M.M. (2006). Multicolor Spectral Karyotyping of the L5178Y $TK^{+/-}$-3.7.2C Mouse Lymphoma Cell Line, Environ. Mol. Mutagen., 47 (2): 127-131.

(31) Fellows, M.D., McDermott, A., Clare, K.R., Doherty, A. and Aardema, M.J. (2014). The Spectral Karyotype of L5178Y $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells Clone 3.7.2C and Factors Affecting Mutant Frequency at the Thymidine Kinase (TK) Locus in the Microtitre Mouse Lymphoma Assay, Environ. Mol. Mutagen., 55 (1): 35-42.

(32) Storer, R.D., Jraynak, A.R., McKelvey, T.W., Elia, M.C., Goodrow, T.L. and DeLuca, J.G. (1997). The Mouse Lymphoma L5178Y $TK^{+/-}$ Cell Line is Heterozygous for a Codon 170 Mutation in the P53 Tumor Suppressor Gene. Mutation. Res., 373 (2): 157-165.

(33) Clark L.S., Harrington-Brock, K., Wang, J., Sargent, L., Lowry, D., Reynolds, S.H. and Moore, M.M. (2004). Loss of P53 Heterozygosity is not Responsible for the Small Colony Thymidine Kinase Mutant Phenotype in L5178Y Mouse Lymphoma Cells. Mutagen., 19 (4): 263-268.

(34) Skopek T.R., Liber, H.L., Penman, B.W. and Thilly, W.G. (1978). Isolation of a Human Lymphoblastoid Line Heterozygous at the Thymidine Kinase Locus: Possibility for a Rapid Human Cell Mutation Assay. Biochem. Biophys. Res. Commun., 84 (2): 411–416.

(35) Honma M. (2005). Generation of Loss of Heterozygosity and its Dependency on P53 Status in Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 45 (2-3): 162-176.

(36) Xia, F., Wang, X., Wang, Y.H., Tsang, N.M., Yandell, D.W., Kelsey, K.T. and Liber, H.L. (1995). Altered P53 Status Correlates with Differences in Sensitivity to Radiation-Induced Mutation and Apoptosis in Two Closely Related Human Lymphoblast Lines. Cancer. Res., 55 (1): 12-15.

▼**M8**

(37) Lorge, E., M. Moore, J. Clements, M. O Donovan, M. Honma, A. Kohara, J. van Benthem, S. Galloway, M.J. Armstrong, V. Thybaud, B. Gollapudi, M. Aardema, J. Kim, A. Sutter, D.J. Kirkland (2015). Standardized Cell Sources and Recommendations for Good Cell Culture Practices in Genotoxicity Testing. (Manuscript in preparation).

(38) Lloyd M. and Kidd D. (2012). The Mouse Lymphoma Assay. Springer Protocols: Methods in Molecular Biology 817, Genetic Toxicology Principles and Methods, ed. Parry and Parry, Humana Press. ISBN, 978-1-61779-420-9, 35-54.

(39) Mei N., Guo X. and Moore M.M. (2014). Methods for Using the Mouse Lymphoma Assay to Screen for Chemical Mutagenicity and Photo-Mutagenicity. In: Optimization in Drug Discover: *In Vitro* Methods: Yan Z and Caldwell(Eds) , 2nd Edition, GW; Humana Press, Totowa, NJ.

(40) Liber H.L. and Thilly W.G. (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploidhuman Lymphoblasts. Mutation Res., 94 (2): 467-485.

(41) Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, OW., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G. and Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. ATLA, 33 (3): 261-287.

(42) Moore M.M. and Howard B.E. (1982). Quantitation of Small Colony Trifluorothymidine-Resistant Mutants of L5178Y/TK+/- Mouse Lymphoma Cells in RPMI-1640 Medium, Mutation Res., 104 (4-5): 287-294.

(43) Ames B.N., McCann J. and Yamasaki E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31 (6): 347-364.

(44) Maron D.M. and Ames B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113 (3-4): 173-215.

(45) Natarajan, A.T., Tates, A.D, Van Buul, P.P.W., Meijers, M. and De Vogel, N. (1976). Cytogenetic Effects of Mutagens/Carcinogens After Activation in a Microsomal System *In Vitro*, I. Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes. Mutation Res., 37 (1): 83-90.

(46) Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidate M. Jr. (1979). Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*. Mutation Res., 66 (3): 277-290.

(47) Ong T.M., *et al.* (1980). Differential Effects of Cytochrome P450-Inducers on Promutagen Activation Capabilities and Enzymatic Activities of S-9 from Rat Liver, J. Environ. *Pathol*. *Toxicol*., 4 (1): 55-65

(48) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R., Gatehouse, D.G., Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternatives to Aroclor 1254-Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagen., 7 (3): 175-177.

(49) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing. de Serres F.J., *et al.* (Eds, Elsevier, North-Holland, pp. 85-88.

▼**M8**

(50) Galloway S.M., *et al.* (1994). Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations. Mutation Res., 312 (3): 241-261.

(51) Johnson T.E., Umbenhauer D.R. and Galloway S.M. (1996). Human Liver S-9 Metabolic Activation: Proficiency in Cytogenetic Assays and Comparison with Phenobarbital/Beta-Naphthoflavone or Aroclor 1254 Induced Rat S-9, Environ. Mol. Mutagen., 28 (1): 51-59.

(52) PNUMA (2001). Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).

(53) Krahn D.F., Barsky F.C. and McCooey K.T. (1982). CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Genotoxic Effects of Airborne Agents Tice R.R., Costa D.L.and Schaich K.M. (Eds.). New York, Plenum, pp. 91-103.

(54) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environ. Mutagen., 5 (6): 795-801.

(55) Asakura M., Sasaki T., Sugiyama T., Arito H., Fukushima, S. and Matsushima, T. (2008). An Improved System for Exposure of Cultured Mammalian Cells to Gaseous Compounds in the Chromosomal Aberration Assay. Mutation Res., 652 (2): 122-130.

(56) Arlett C.F., *et al.* (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J. (Ed.), CambridgeUniversity Press, pp. 66-101.

(57) Morita T., Honma M. and Morikawa K. (2012). Effect of Reducing the Top Concentration Used in the *In Vitro* Chromosomal Aberration Test in CHL Cells on the Evaluation of Industrial Chemical Genotoxicity. Mutation Res., 741 (1-2): 32-56.

(58) Brookmire L., Chen J.J. and Levy D.D. (2013). Evaluation of the Highest Concentrations Used in the *In Vitro* Chromosome Aberrations Assay. Environ. Mol. Mutagen., 54 (1): 36-43.

(59) USFDA (2012). International Conference on Harmonisation (ICH) Guidance S2 (R1) on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended For Human Use. Disponible en: [https://www.federalregister.gov/a/2012-13774].

(60) Honma M. and Hayashi M. (2011). Comparison of *In Vitro* Micronucleus and Gene Mutation Assay Results for P53-Competent Versus P53-Deficient Human Lymphoblastoid Cells. Environ. Mol. Mutagen., 52 (5): 373-384.

(61) Moore-Brown, M.M., Clive, D., Howard, B.E., Batson, A.G. and Johnson, K.O. (1981). The Utilization of Trifluorothymidine (TFT) to Select for Thymidine Kinase-Deficient ($TK^{-/-}$) Mutants from L5178Y/$TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells, Mutation Res., 85 (5): 363-378.

(62) Liber H.L., Yandell D.W. and Little J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HRPT Loci in Human Lymphoblastoid Cells; Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK locus. Mutation Res., 216 (1): 9-17.

(63) Furth E.E., Thilly, W.G., Penman, B.W., Liber, H.L. and Rand, W.M. (1981). Quantitative Assay for Mutation in Diploid Human Lymphoblasts Using Microtiter Plates. Anal. Biochem., 110 (1): 1-8.

(64) Hayashi, M, Dearfield, K., Kasper, P., Lovell, D., Martus, H. J. and Thybaud, V. (2011). Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data, Mutation Res., 723 (2): 87-90.

▼**M8**

(65) Ryan T.P. (2000). Statistical Methods for Quality Improvement. John Wiley and Sons, New York 2nd Edition.

(66) OCDE (2014). Statistical analysis supporting the revision of the genotoxicity Test Guidelines. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 199), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(67) Fleiss J.L., Levin B. and Paik M.C. (2003). Statistical Methods for Rates and Proportions, Third Edition, New York: John Wiley & Sons.

▼M8

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Anéugeno**: Producto o proceso que, por interacción con los componentes del ciclo de división celular mitótica y meiótica, produce la aneuploidía de células u organismos.

**Aneuploidía**: Desviación respecto al número diploide (o haploide) normal de cromosomas que afecta a uno o varios cromosomas, pero no a dotaciones completas de cromosomas (poliploidía).

**Mutágenos por sustitución de pares de bases**: Productos que provocan la sustitución de pares de bases en el ADN.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Eficiencia de clonación**: Porcentaje de células sembradas a baja densidad que pueden crecer para formar una colonia que puede contarse.

**Clastógeno**: Producto o proceso que provoca aberraciones cromosómicas estructurales en poblaciones de células u organismos.

**Citotoxicidad**: Para los ensayos incluidos en este método de ensayo, la citotoxicidad se identifica como una reducción del crecimiento relativo total (CRT) o de la supervivencia relativa (SR) respecto a los ensayos MLA y TK6, respectivamente.

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

**Mutágenos por desplazamiento del marco de lectura**: Productos que provocan la adición o supresión de uno o varios pares de bases en la molécula de ADN.

**Genotoxicidad**: Término general que engloba todos los tipos de lesión del ADN o del cromosoma, con inclusión de roturas de ADN, aductos, reorganizaciones, mutaciones, aberraciones cromosómicas, y aneuploidía. No todos los tipos de efectos genotóxicos resultan en mutaciones o en lesiones cromosómicas estables.

**Recombinación mitótica**: Durante la mitosis, recombinación entre cromátidas homólogas que puede dar lugar a la inducción de roturas de la doble cadena de ADN, o a una pérdida de heterocigosis.

**Mutágeno**: Agente que provoca un cambio hereditario en una o varias secuencias de pares de bases del ADN en los genes o en la estructura de los cromosomas (aberraciones cromosómicas).

**Frecuencia de mutantes (FM)**: Número de células mutantes observadas dividido por el número de células viables.

**Período de expresión fenotípica**: Tiempo después del tratamiento en el que la alteración genética se fija en el genoma y los eventuales productos génicos preexistentes se agotan hasta que se modifica el rasgo fenotípico.

**Supervivencia relativa (SR)**: Se utiliza como medida de la citotoxicidad relacionada con el tratamiento en el ensayo TK6. Es la eficiencia de clonación relativa (EC) de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento celular ajustada para tener en cuenta la pérdida de células durante el tratamiento en comparación con la eficiencia de clonación del testigo negativo.

▼**M8**

**Crecimiento relativo en la suspensión (CRS)**: Para el ensayo MLA, el crecimiento relativo total en la suspensión durante dos días del cultivo de ensayo, en comparación con el crecimiento total en la suspensión durante dos días del testigo negativo / control del disolvente (Clive y Spector, 1975). El CRS debe incluir el crecimiento relativo del cultivo de ensayo en comparación con el testigo negativo / control del disolvente durante el período de tratamiento.

**Crecimiento relativo total (CRT)**: Se utiliza como medida de la citotoxicidad relacionada con el tratamiento en el ensayo MLA. Es una medida del crecimiento relativo (comparado con el control del vehículo) de los cultivos de ensayo durante el tratamiento, el periodo de expresión de dos días y la fase de clonación de la selección de mutantes del ensayo. El CRT de cada cultivo de ensayo se multiplica por la eficiencia relativa de clonación del cultivo de ensayo en el momento de la selección de los mutantes y se expresa en relación con la eficiencia de clonación del testigo negativo / control del disolvente (Clive y Spector, 1975).

**Fracciones hepáticas S9**: Sobrenadante de homogeneizado de hígado después de centrifugación a 9 000 g, es decir, extracto de hígado crudo.

**Mezcla S9**: Mezcla de la fracción hepática S9 y de cofactores necesarios para la actividad metabólica de las enzimas.

**Crecimiento en la suspensión (CS)**: El factor multiplicador del número de células a lo largo de las fases de tratamiento y expresión del MLA. El CS se calcula multiplicando el factor multiplicador del día 1 por el factor multiplicador del día 2 en caso de un tratamiento corto (3 o 4 horas). Si se utiliza un tratamiento de 24 horas, el CS es el factor multiplicador durante el tratamiento de 24 horas, multiplicado por los factores multiplicadores de los días 1 y 2.

**Control del disolvente**: Término general para definir los cultivos testigo que reciben solo el disolvente utilizado para disolver el producto problema.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Testigos sin tratar**: Cultivos que no reciben tratamiento (es decir, ni producto problema ni disolvente), pero que se someten al mismo proceso que los cultivos que reciben el producto problema.

▼M8

*Apéndice 2*

FÓRMULAS

**Citotoxicidad**

*Para las dos versiones del MLA (con agar y con micropocillos)*

La citotoxicidad se define como el crecimiento relativo total (CRT), que incluye el crecimiento relativo en la suspensión (CRS) durante el período de expresión de 2 días y la eficiencia relativa de clonación (ERC) obtenida en el momento de la selección de los mutantes. Los valores de CRT, CRS y ERC se expresan en porcentaje.

**Cálculo del CRS:** El crecimiento en la suspensión uno ($CS_1$) es la tasa de crecimiento entre el día 0 y el día 1 (concentración celular el día 1 / concentración celular el día 0) y el crecimiento en la suspensión dos ($CS_2$) es la tasa de crecimiento entre el día 1 y el día 2 (concentración celular el día 2 / concentración celular el día 1). El CRS es el CS total ($CS_1$ x $CS_2$) del cultivo tratado en comparación con el testigo sin tratar / control del disolvente. Esto es: CRS = $[CS_{1(tratado)}$ x $CS_{2(tratado)}]$ / $[CS_{1(testigo)}$ x $CS_{2(testigo)}]$ El $CS_1$ debe calcularse a partir de la concentración celular inicial utilizada al principio del tratamiento de las células. Esto tiene en cuenta la evenutal citotoxicidad diferencial que se produzca en los cultivos de ensayo durante el tratamiento celular.

La ERC es la eficiencia relativa de clonación del cultivo tratado en comparación con la eficiencia relativa de clonación del testigo sin tratar / control del disolvente obtenida en el momento de la selección de los mutantes.

***Crecimiento relativo total (CRT):*** CRT = CRS x ERC

**TK6**

**Supervivencia relativa (SR):**

La citotoxicidad se evalúa mediante la supervivencia relativa, es decir, la eficiencia de clonación (EC) de las células sembradas inmediatamente después del tratamiento, ajustada para tener en cuenta la eventual pérdida de células durante el tratamiento en comparación con la eficiencia de clonación en los testigos negativos (a los que se asigna una supervivencia del 100 %). El ajuste para tener en cuenta la pérdida de células durante el tratamiento puede calcularse como sigue:

$$\text{EC ajustada} = \text{EC} \times \frac{\textit{Número de células al final del tratamiento}}{\textit{Número de células al inicio del tratamiento}}$$

La SR correspondiente a un cultivo tratado con un producto problema se calcula de la siguiente manera:

$$SR = \frac{\textit{EC ajustada en el cultivo tratado}}{\textit{EC ajustada en el control del disolvente}} \times 100$$

**Frecuencia de mutantes tanto con MLA como con TK6**

La frecuencia de mutantes (FM) es la eficiencia de clonación de las colonias mutantes en el medio selectivo ($EC_M$) dividida por la eficiencia de clonación en el medio no selectivo en relación en el momento de la selección ($EC_V$). Es decir, FM = $EC_M/EC_V$. El cálculo de estas dos eficiencias de clonación se describe a continuación para los métodos de clonación con agar y con micropocillos.

▼**M8**

***Versión del MLA con agar***: En la versión del MLA con agar blando, el número de colonias en la placa de selección de mutantes ($C_M$) y el número de colonias en la placa de eficiencia de clonación o sin selección (recuento de viables) ($C_V$) se obtienen mediante el recuento directo de los clones. Para ver la eficiencia de clonación (EC) se utilizan las fórmulas siguientes cuando se siembran 600 células en las placas de selección de mutantes ($EC_M$) y en las placas de eficiencia de la clonación o sin selección (recuento de viables) ($EC_V$) y se utilizan $3 \times 10^6$ células para la selección de mutantes:

$EC_M = C_M / (3 \times 10^6) = (C_M / 3) \times 10^{-6}$

$EC_V = C_V / 600$

***Versión del MLA y TK6 con micropocillos:*** En la versión del MLA con micropocillos, los valores de $C_M$ y $C_V$ se determinan como el producto del número total de micropocillos (TW) y del número probable de colonias por pocillo (P) en las placas de micropocillos.

$C_M = P_M \times TW_M$

$C_V = P_V \times TW_V$

A partir del término cero de la distribución de Poisson (Furth *et al*., 1981), el valor de P viene dado por:

$P = - \ln (EW / TW)$

donde EW es el número de pocillos vacíos y TW es el número total de pocillos. Por tanto,

$EC_M = C_M / T_M = (P_M \times TW_M) / T_M$

$EC_V = C_V / T_V = (P_V \times TW_V) / T_V$

En el caso de la versión con micropocillos del MLA, las frecuencias de mutantes de colonias pequeñas y grandes se calcularán de la misma manera, utilizando el número pertinente de pocillos vacíos correspondientes a las colonias pequeñas y grandes.

En el caso del TK6, las frecuencias de mutantes de colonias pequeñas y grandes se basan en los mutantes de aparición temprana y de aparición tardía.

▼M8

B.68. **MÉTODO DE ENSAYO IN VITRO CON EXPOSICIÓN DE BREVE DURACIÓN PARA DETECTAR: I) PRODUCTOS QUE PROVOCAN LESIONES OCULARES GRAVES Y II) PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN POR IRRITACIÓN OCULAR O LESIONES OCULARES GRAVES**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 491 de la OCDE (2017). El método de ensayo con exposición de breve duración (EBD) es un método *in vitro* que puede utilizarse en determinadas circunstancias y con limitaciones específicas para la clasificación de los peligros y el etiquetado de productos (sustancias y mezclas) que provocan lesiones oculares graves, así como de aquellos que no requieren clasificación por lesiones oculares graves ni por irritación ocular, según se definen en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y el Reglamento (UE) n.º 1272/2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea ([1]).

2. Durante muchos años, el potencial de peligro para los ojos de los productos se ha evaluado principalmente mediante un ensayo *in vivo* con ojos de conejo [método B.5 (8), equivalente a las directrices TG 405 de la OCDE)]. Generalmente se acepta que, en un futuro próximo, ningún ensayo alternativo *in vitro* podrá sustituir completamente por sí solo el ensayo *in vivo* con ojos de conejo para evaluar toda la gama de respuestas de lesiones oculares graves o de irritación ocular que pueden causar diferentes clases de productos. Sin embargo, unas combinaciones estratégicas de métodos de ensayo alternativos dentro de una estrategia de ensayos (escalonados) sí podrán sustituir completamente al ensayo con ojos de conejo (2). El enfoque descendente está diseñado para ensayar productos de los que quepa esperar, sobre la base de la información existente, que tengan un alto potencial de irritación o provoquen lesiones oculares graves. Por el contrario, el enfoque ascendente está diseñado para ensayar productos de los que quepa esperar, sobre la base de la información existente, que no provoquen una irritación ocular suficiente para exigir una clasificación. Si bien el método de ensayo EBD no se considera una sustitución completa del ensayo con ojos de conejo *in vivo*, puede utilizarse como parte de una estrategia de ensayo escalonada para la clasificación y el etiquetado normativos, como es el enfoque descendente/ascendente, para detectar sin necesidad de realizar más ensayos i) los productos que provocan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) y ii) los productos (salvo las sustancias muy volátiles y todos los productos sólidos distintos de los tensioactivos) que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (1) (2). Sin embargo, un producto del que no pueda decirse mediante el método de ensayo EBD que causa lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) ni que corresponde al grupo sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (no induce lesiones oculares graves ni irritación ocular), requeriría ensayos adicionales para establecer una clasificación definitiva. Además, hay que consultar a las autoridades reguladoras competentes antes de utilizar el ensayo EBD en un enfoque ascendente en relación con otros regímenes de clasificación distintos del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. La elección del método de ensayo más adecuado y el uso de este método de ensayo deben considerarse en el contexto del documento de orientación de la OCDE sobre un enfoque integrado de ensayos y evaluación de las lesiones oculares graves y la irritación ocular (14).

3. El objetivo del presente método de ensayo es describir los procedimientos utilizados para evaluar el potencial de peligro para los ojos de un producto problema en función de su capacidad de inducir citotoxicidad en el método

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M8**

de ensayo con exposición de breve duración. El efecto citotóxico de los productos en las células epiteliales de la córnea es un modo de acción importante (MDA) que lleva a lesiones epiteliales de la córnea e irritación ocular. La viabilidad celular en el método de ensayo EBD se evalúa mediante la medición cuantitativa, tras la extracción de las células, de la sal de formazano azul producida por las células vivas a través de la conversión enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)], también conocido como bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo (3). La viabilidad celular obtenida se compara con el control del disolvente (viabilidad relativa) y se utiliza para estimar el potencial de peligro para los ojos que tiene el producto problema. Un producto problema se clasifica en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP cuando tanto la concentración del 5 % como la del 0,05 % dan lugar a una viabilidad celular menor o igual (≤) al 70 %. Por el contrario, un producto problema se asigna al grupo sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP cuando tanto la concentración del 5 % como la del 0,05 % dan lugar a una viabilidad celular superior (>) al 70 %.

4. El término «producto problema» se utiliza en el presente método de ensayo para referirse al objeto del ensayo y no está relacionado con la aplicabilidad del método de ensayo EBD al ensayo de sustancias o mezclas. En el apéndice se dan las definiciones utilizadas.

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

5. Este método de ensayo se basa en un protocolo elaborado por Kao Corporation (4), que fue objeto de dos estudios de validación diferentes: uno por el Comité de Validación de la Sociedad Japonesa para la Alternativa a la Experimentación con Animales (Japanese Society for Alternative to Animal Experiments, JSAAE) (5) y otro por elCentro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods, JaCVAM) (6). NICEATM/ICCVAM han efectuado una revisión por pares sobre la base de los informes de los estudios de validación y de los documentos de revisión de fondo del método de ensayo (7).

6. Cuando se utiliza para detectar productos (sustancias y mezclas) que provocan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (1), los datos obtenidos con el método de ensayo EBD respecto a 125 productos (entre los que se incluyen tanto sustancias como mezclas) muestran una exactitud global del 83 % (104/125), una tasa de falsos positivos del 1 % (1/86) y una tasa de falsos negativos del 51 % (20/39) en comparación con el ensayo *in vivo* con ojos de conejo (7). La tasa obtenida de falsos negativos no es crítica en el contexto actual, ya que todos los productos problema que inducen una viabilidad celular ≤ 70 % a una concentración del 5 % y > 70 % a una concentración del 0,05 % serían analizadas posteriormente con otros métodos de ensayo *in vitro* debidamente validados o, como última opción, en el ensayo con ojos de conejo *in vivo*, en función de los requisitos normativos y de conformidad con la estrategia de evaluación secuencial y con los enfoques de ponderación de las pruebas recomendados actualmente (1) (8). Se sometieron a ensayo principalmente sustancias de un solo componente, aunque también se dispone de una cantidad limitada de datos sobre ensayos con mezclas. Sin embargo, el método de ensayo es técnicamente aplicable a los ensayos de sustancias de componentes múltiples y de mezclas. No obstante, antes de la utilización de este método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la normativa impone el ensayo de la mezcla. El método de ensayo EBD no ha mostrado ninguna otra deficiencia específica cuando se utiliza para identificar productos problema como de categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Los investigadores podrían considerar la posibilidad de utilizar este método de ensayo con productos problema, de manera que una viabilidad celular ≤ 70 % a las concentraciones tanto del 5 % como del 0,05 % debería aceptarse como indicativa de una respuesta inductora de lesiones oculares graves que impondría la clasificación en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP sin más ensayos.

▼**M8**

7. Cuando se utiliza para detectar productos (sustancias y mezclas) que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (es decir, sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP), los datos obtenidos con el método de ensayo EBD respecto a 130 productos (entre los que se incluyen tanto sustancias como mezclas) muestran una exactitud global del 85 % (110/130), una tasa de falsos negativos del 12 % (9/73) y una tasa de falsos positivos del 19 % (11/57) en comparación con el ensayo *in viv*o con ojos de conejo (7). Si se excluyen del conjunto de datos las sustancias muy volátiles y las sustancias sólidas distintas de los tensioactivos, la exactitud global mejora al 90 % (92 /102), la tasa de falsos negativos al 2 % (1/54), y la de falsos positivos al 19 % (9/48) (7). Como consecuencia de ello, las posibles deficiencias del método de ensayo EBD cuando se utiliza para identificar productos problema que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) son una tasa elevada de falsos negativos para i) sustancias muy volátiles, con una presión de vapor de más de 6 kPa, y ii) productos sólidos (sustancias y mezclas) distintos de los tensioactivos y las mezclas compuestas únicamente de tensioactivos. Estos productos están excluidos del ámbito de aplicación del método de ensayo EBD (7).

8. Además de los productos mencionados en los puntos 6 y 7, el conjunto de datos generados por el método de ensayo EBD contiene también datos internos sobre 40 mezclas, que, en comparación con el ensayo ocular de Draize *in vivo*, muestran una exactitud del 88 % (35/40), una tasa de falsos positivos del 50 % (5/10), y una tasa de falsos negativos del 0 % (0/30) para asignar mezclas que no requieren clasificación con arreglo a los sistemas de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (9). Por lo tanto, el método de ensayo EBD se puede aplicar para detectar las mezclas del grupo sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP en un enfoque ascendente, salvo las mezclas sólidas distintas de las constituidas únicamente por tensioactivos como ampliación de su limitación respecto a las sustancias sólidas. Además, las mezclas que contengan sustancias con presión de vapor superior a 6 kPa deben evaluarse con cuidado para evitar posibles subasignaciones, y deben justificarse caso por caso.

9. El método de ensayo EBD no puede utilizarse para la detección de los productos problema de la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, ni de la categoría 2A (irritación ocular) o 2B (irritación ocular leve) del SGA de las Naciones Unidas, debido al considerable número de productos de la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas que resultan subasignadas como de categoría 2, 2A o 2 B, y de productos del grupo sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP que resultan sobreasignadas como de categoría 2, 2A o 2B (7). A tal fin, pueden resultar necesarias pruebas adicionales con otro método adecuado.

10. El método de ensayo EBD es adecuado para los productos problema que se disuelven o suspenden uniformemente durante al menos 5 minutos en suero fisiológico, dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 % en solución salina, o en aceite mineral. El método de ensayo EBD no es adecuado para los productos problema que son insolubles o que no se suspenden uniformemente durante al menos 5 minutos en suero fisiológico, dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 % en solución salina, o en aceite mineral. El uso de aceite mineral en el método de ensayo EBD es posible a causa de la breve duración de la exposición. Por lo tanto, el método de ensayo EBD es adecuado para prever el potencial de peligro para los ojos que tienen los productos problema insolubles en agua (por ejemplo, cetonas o alcoholes grasos de cadena larga) siempre que sean miscibles en al menos uno de los tres disolventes propuestos (4).

▼M8

11. El término «producto problema» se utiliza en el presente método de ensayo para referirse al objeto del ensayo ([1]) y no está relacionado con la aplicabilidad del método de ensayo EBD al ensayo de sustancias o mezclas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

12. El método de ensayo EBD consiste en un ensayo *in vitro* basado en la citotoxicidad, que se realiza con una monocapa confluente de células de córnea de conejo del Statens Seruminstitut (SIRC), cultivadas en una microplaca de policarbonato de 96 pocillos (4). Tras una exposición de cinco minutos a un producto problema, la citotoxicidad se mide cuantitativamente como la viabilidad relativa de las células SIRC utilizando el ensayo con MTT (4). La disminución de la viabilidad celular se utiliza para predecir los posibles efectos adversos que provocan lesiones oculares.

13. Se ha informado de que el 80 % de una solución aplicada al ojo de un conejo se excreta a través del saco conjuntival en el plazo de tres o cuatro minutos, mientras que más del 80 % de una solución aplicada al ojo humano se excreta en el plazo de uno o dos minutos (10). El método de ensayo EBD intenta aproximar estos tiempos de exposición y utiliza la citotoxicidad como parámetro para evaluar el grado de las lesiones a las células SIRC tras una exposición de cinco minutos al producto problema.

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

14. Antes de proceder al uso sistemático del método de ensayo EBD aquí descrito, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta clasificación de las once sustancias recomendadas en el cuadro 1. Estas sustancias se seleccionaron para representar la gama completa de respuestas en cuanto a lesiones oculares graves o irritación ocular sobre la base de los resultados de los ensayos con ojos de conejo *in vivo* (TG 405) y el sistema de clasificación SGA de las Naciones Unidas y del CLP (1). Entre los otros criterios de selección figuran los siguientes: que las sustancias estén disponibles en el mercado, que se disponga de datos de referencia *in vivo* de alta calidad y que se disponga de datos *in vitro* de alta calidad procedentes del método de ensayo EBD (3). Cuando una sustancia de la lista no esté disponible o en casos justificados, podrá utilizarse otra sustancia sobre la que se disponga de datos adecuados de referencia *in vivo* e *in vitro* siempre que se apliquen los mismos criterios de selección que los aquí descritos.

*Cuadro 1*

**Lista de sustancias para la prueba de la competencia**

| Sustancia | N.º CAS | Clase química ([1]) | Estado físico | Categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP según el ensayo *in vivo* ([2]) | Disolvente en el ensayo EBD | Categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP según el ensayo EBD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Cloruro de benzalconio (solución acuosa al 10 %) | 8001-54-5 | Compuesto onio | Líquido | Categoría 1 | Solución salina | Categoría 1 |
| Tritón X-100 (al 100 %) | 9002-93-1 | Éter | Líquido | Categoría 1 | Solución salina | Categoría 1 |

([1]) En junio de 2013, la reunión conjunta (Joint Meeting) acordó que, en la medida de lo posible, debe aplicarse ahora un uso más coherente del término «producto problema» para describir el objeto del ensayo en los métodos de ensayo nuevos y actualizados.

▼**M8**

| Sustancia | N.º CAS | Clase química ([1]) | Estado físico | Categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP según el ensayo *in vivo* ([2]) | Disolvente en el ensayo EBD | Categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP según el ensayo EBD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Acid Red 92 | 18472-87-2 | Compuesto heterocíclico; compuesto bromado; compuesto clorado | Sólido | Categoría 1 | Solución salina | Categoría 1 |
| Hidróxido de sodio | 1310-73-2 | Álcali; producto inorgánico | Sólido | Categoría 1 ([3]) | Solución salina | Categoría 1 |
| Butirolactona | 96-48-0 | Lactona; compuesto heterocíclico | Líquido | Categoría 2A (categoría 2 en CLP) | Solución salina | No puede hacerse ninguna asignación. |
| 1-Octanol | 111-87-5 | Alcohol | Líquido | Categoría 2A/B ([4]) (categoría 2 en CLP) | Aceite mineral | No puede hacerse ninguna asignación. |
| Ciclopentanol | 96-41-3 | Alcohol; Hidrocarburo (cíclico) | Líquido | Categoría 2A/B ([5]) (categoría 2 en CLP) | Solución salina | No puede hacerse ninguna asignación. |
| Acetato de 2-etoxietilo | 111-15-9 | Alcohol; éter | Líquido | Sin categoría | Solución salina | Sin categoría |
| Dodecano | 112-40-3 | Hidrocarburo (acíclico) | Líquido | Sin categoría | Aceite mineral | Sin categoría |
| Metil-isobutil-cetona | 108-10-1 | Cetona | Líquido | Sin categoría | Aceite mineral | Sin categoría |

▼**M8**

| Sustancia | N.º CAS | Clase química ([1]) | Estado físico | Categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP según el ensayo *in vivo* ([2]) | Disolvente en el ensayo EBD | Categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP según el ensayo EBD |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Sulfato de 1,1-dimetilguanidina | 598-65-2 | Amidina; compuesto de azufre | Sólido | Sin categoría | Solución salina | Sin categoría |

([1]) Las clases químicas se han asignado utilizando la información obtenida de publicaciones anteriores del NICEATM y, en caso de no estar disponibles, utilizando el sistema National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH®) [a través de ChemIDplus® (National Library of Medicine), disponible en http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/] y las determinaciones de la estructura hechas por el NICEATM.

([2]) Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (TG 405 de la OCDE) y utilizando el SGA de las Naciones Unidas y del CLP (1).

([3]) La clasificación en la categoría 1 se basa en el potencial corrosivo cutáneo del hidróxido de sodio al 100 % (incluido como producto para la prueba de la competencia con potencial corrosivo cutáneo en las directrices de ensayo TG 435 de la OCDE) y en el criterio para la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (1).

([4]) La clasificación en las categorías 2A o 2B depende de la interpretación del criterio del SGA de las Naciones Unidas para distinguir entre estas dos categorías, es decir, para generar una clasificación en la categoría 2A son necesarios dos de seis frente a cuatro de seis animales que presentan efectos el día 7. El conjunto de datos *in vivo* incluía dos estudios con tres animales cada uno. En un estudio, dos de los tres animales mostraban efectos el día 7, lo que justifica la clasificación en la categoría 2A (11), mientras que en el segundo estudio todos los parámetros con los tres animales se recuperaban hasta una puntuación de cero el día 7, lo que justifica la clasificación en la categoría 2B (12).

([5]) La clasificación como 2A o 2B depende de la interpretación del criterio del SGA de las Naciones Unidas para distinguir entre estas dos categorías, es decir, para generar una clasificación en la categoría 2A debe haber uno de tres o bien dos de tres animales con efectos el día 7. El estudio *in vivo* incluía tres animales. Todos los parámetros salvo la opacidad de la córnea y el enrojecimiento de la conjuntiva en un solo animal se recuperaron hasta una puntuación de cero para el día 7 o antes. El único animal que no estaba recuperado completamente para el día 7 tuvo una puntuación de 1 en cuanto a la opacidad de la córnea y de 1 en cuanto al enrojecimiento de la conjuntiva (el día 7), con recuperación plena el día 14 (11).

Abreviaturas: Nº CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

PROCEDIMIENTO

**Preparación de la monocapa celular**

15. Para llevar a cabo el método de ensayo EBD debe utilizarse la línea celular de córnea de conejo SIRC. Se recomienda que las células SIRC se obtengan a partir de un banco de células adecuado, por ejemplo la CCL60 de la American Type Culture Collection.

16. Se cultivan las células SIRC a 37 °C en atmósfera humidificada y con un 5 % de $CO_2$, en un matraz de cultivo con medio de cultivo que comprende el medio esencial mínimo (MEM) de Eagle, complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS), L-glutamina 2 mM, 50-100 unidades/ml de penicilina y 50-100 µg/ml de estreptomicina. Las células que hayan llegado a ser confluyentes en el matraz de cultivo deben separarse por medio de la solución de tripsina con ácido etilendiaminotetraacético, eventualmente utilizando un raspador celular. Se propagan las células (por ejemplo, 2 o 3 pases) en un matraz de cultivo antes de emplearse en los ensayos sistemáticos y no deben ser objeto de más de 25 pases tras la descongelación.

17. Las celdas listas para su uso en el ensayo EBD se preparan a continuación a la densidad adecuada y se siembran en placas de 96 pocillos. La densidad de siembra celular recomendada es de $6{,}0 \times 10^3$ células por pocillo cuando se utilizan las células cuatro días después de la siembra, o de $3{,}0 \times 10^3$ células por pocillo cuando se utilizan las células cinco días después de la siembra, con un volumen de cultivo de 200 µl. Las células utilizadas en el ensayo EBD sembradas en un medio de cultivo a la densidad apropiada alcanzarán una confluencia de más del 80 % en el momento del ensayo, es decir, cuatro o cinco días después de la siembra.

**Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo**

18. La primera opción de disolvente para disolver o suspender los productos problema es el suero fisiológico. Si el producto problema presenta baja

▼M8

solubilidad o no puede disolverse o suspenderse de manera uniforme durante al menos cinco minutos en solución salina sola, se utiliza la solución salina con un 5 % de DMSO (n.º CAS 67-68-5) como segunda opción. En el caso de los productos problema que no puedan disolverse ni suspenderse de manera uniforme durante al menos cinco minutos en solución salina sola o con un 5 % de DMSO, el aceite mineral (n.º CAS 8042-47-5) se utiliza como disolvente de tercera opción.

19. Los productos problema se disuelven o suspenden uniformemente en el disolvente seleccionado, a una concentración del 5 % (p/p), y se someten posteriormente a dicuciones decimales en serie hasta llegar a las concentraciones del 0,5 % y 0,05 %. Cada producto problema debe someterse a ensayo a las dos concentraciones del 5 % y del 0,05 %. Las células cultivadas en la placa de 96 pocillos se exponen a 200 µl/pocillo de la solución (o suspensión) del producto problema a la concentración del 5 % o del 0,05 % durante cinco minutos a temperatura ambiente. Los productos problema (sustancias de un solo componente o sustancias de componentes múltiples o mezclas) se consideran sustancias puras y se diluyen o se suspenden con arreglo al método, independientemente de su pureza.

20. El medio de cultivo descrito en el punto 16 se utiliza como testigo del medio en cada placa de cada repetición. Además, las células han de exponerse también a muestras de control del disolvente en cada placa de cada repetición. Se ha confirmado que los disolventes enumerados en el punto 18 no tienen ningún efecto adverso sobre la viabilidad de las células SIRC.

21. En el método de ensayo EBD, se debe utilizar como testigo positivo en cada placa de cada repetición solución salina con un 0,01 % de laurilsulfato sódico (LSS). Para calcular la viabilidad celular del testigo positivo, cada placa de cada repetición debe incluir también un control del disolvente salino.

22. Es necesario un ensayo en blanco para determinar la compensación respecto a la densidad óptica y debe realizarse con pocillos que contengan únicamente solución salina amortiguadora de fosfato, pero sin calcio ni magnesio (PBS-) ni células.

23. Cada muestra (producto problema al 5 % y 0,05 %, testigo del medio, control del disolvente y testigo positivo) debe ensayarse por triplicado en cada repetición, exponiendo las células a 200 µl del producto problema o testigo adecuado durante cinco minutos a temperatura ambiente.

24. Es útil disponer de sustancias de referencia para evaluar el potencial de irritación ocular de sustancias desconocidas dentro de una clase específica de sustancias o productos, o para evaluar la capacidad de irritación relativa de un irritante ocular dentro de una gama específica de respuestas de irritación.

**Medición de la viabilidad celular**

25. Tras la exposición, las células se lavan dos veces con 200 µl de PBS y se añaden 200 µl de solución de MTT (0,5 mg MTT/ml de medio de cultivo). Tras un tiempo de reacción de dos horas en una incubadora (37 °C, 5 % de $CO_2$), se decanta la solución de MTT, se extrae el formazano de MTT mediante la adición de 200 µl de isopropanol-ácido clorhídrico 0,04 N durante 60 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente, y la absorbancia del formazano de MTT se mide a 570 nm con un lector de placas. Se produce interferencia de los productos problema con el ensayo del MTT (en caso de colorantes o reductores directos del MTT) solo si se mantiene una cantidad significativa de producto problema en el sistema de ensayo después del lavado tras la exposición, lo que sucede con los tejidos de epidermis humana reconstruida o la córnea humana reconstruida en 3D, pero no es pertinente en el caso de los cultivos celulares de 2D utilizados para el método de ensayo EBD.

▼M8

**Interpretación de los resultados y modelo de asignación**

26. Los valores de densidad óptica (DO) obtenidos con cada producto problema se utilizan a continuación para calcular la viabilidad celular respecto a la del control del disolvente, que se fija arbitrariamente en el 100 %. La viabilidad celular relativa se expresa en porcentaje y se obtiene dividiendo la DO del producto problema por la DO del control del disolvente, después de restar de ambos valores la DO del ensayo en blanco.

$$Viabilidad\ celular(\%) = \frac{(DO_{570}producto\ problema) - (DO_{570}blanco)}{(DO_{570}control\ disolvente) - (DO_{570}blanco)} \times 100$$

Análogamente, la viabilidad celular relativa se expresa en porcentaje y se obtiene dividiendo la DO del producto problema por la DO del control del disolvente, después de restar de ambos valores la DO del ensayo en blanco.

27. Deben efectuarse tres repeticiones independientes, cada una de ellas con tres pocillos replicados (es decir, n = 9). Para calcular la media aritmética de la viabilidad celular relativa se utiliza la media aritmética de los tres pocillos de cada producto problema y del control del disolvente en cada repetición independiente. La media aritmética final de la viabilidad celular se calcula a partir de las tres repeticiones independientes.

28. A continuación figuran los valores de corte de la viabilidad celular para la identificación de productos problema que provocan lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) y de productos problema que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP).

*Cuadro 2*

**Modelo de asignación del método de ensayo EBD**

| Viabilidad celular | | Clasificación del SGA de las Naciones Unidas / CLP | Aplicabilidad |
|---|---|---|---|
| Al 5 % | Al 0,05 % | | |
| > 70 % | > 70 % | Sin categoría | Sustancias y mezclas, excepto: i) las sustancias muy volátiles, con una presión de vapor de más de 6 kPa ([1]) y ii) los productos sólidos (sustancias y mezclas) distintos de los tensioactivos y las mezclas que solo se componen de tensioactivos |
| ≤ 70 % | > 70 % | No puede hacerse ninguna asignación. | No aplicable. |
| ≤ 70 % | ≤ 70 % | Categoría 1 | Sustancias y mezclas ([2]) |

([1]) Las mezclas que contengan sustancias con presión de vapor superior a 6 kPa deben evaluarse con cuidado para evitar posibles subasignaciones, y deben justificarse caso por caso.

([2]) Sobre la base de los resultados obtenidos principalmente con sustancias de un solo componente, aunque también existe una cantidad limitada de datos sobre los ensayos de mezclas. Sin embargo, el método de ensayo es técnicamente aplicable a los ensayos de sustancias de componentes múltiples y de mezclas. Antes de la utilización de este método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué. Tales consideraciones no son necesarias si la normativa impone el ensayo de la mezcla.

▼M8

**Criterios de aceptación**

29. Los resultados de los ensayos se consideran aceptables cuando se cumplen los siguientes criterios:

a) La densidad óptica del testigo del medio (exposición al medio de cultivo) debe ser igual o superior a 0,3 tras restar la densidad óptica del blanco.

b) La viabilidad del control del disolvente debe ser igual o superior al 80 % respecto al valor del testigo del medio. Si se utilizan varios testigos del disolvente en cada repetición, cada uno de estos testigos debe mostrar una viabilidad celular superior al 80 % para poder evaluar los productos problema ensayados con esos disolventes.

c) La viabilidad celular obtenida con el testigo positivo (LSS al 0,01 %) debe encontrarse dentro del intervalo de dos veces la desviación típica respecto a la media histórica. Los límites de aceptación superior e inferior para el testigo positivo deben actualizarse con frecuencia, es decir, cada tres meses, o cada vez que se realice un ensayo aceptable en los laboratorios en los que se realizan ensayos con poca frecuencia (es decir, menos de una vez al mes). Cuando un laboratorio no complete un número suficiente de experimentos para establecer una distribución de los testigos positivos que sea estadísticamente sólida, puede utilizar los límites de aceptación superior e inferior establecidos por el diseñador del método, es decir, entre el 21,1 % y el 62,3 % en función de sus datos históricos de laboratorio, mientras que durante los primeros ensayos sistemáticos se construye una distribución interna.

d) La desviación típica de la viabilidad celular final derivada de tres repeticiones independientes debe ser inferior al 15 % a las concentraciones tanto del 5 % como del 0,05 % del producto problema.

Si no se cumplen uno o varios de estos criterios, se deben descartar los resultados y se deben realizar otras tres repeticiones independientes.

DATOS E INFORME

**Datos**

30. Deben comunicarse los datos de cada pocillo (por ejemplo, valores de viabilidad celular) de cada repetición, así como la media global, la desviación típica y la clasificación.

**Informe del ensayo**

31. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema y sustancias testigo*

— Sustancias de un solo componente: identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas: caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), según su disponibilidad;

— Estado físico, volatilidad, pH, log P, peso molecular, clase química y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes para la realización del estudio, según su disponibilidad;

▼**M8**

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible.

*Condiciones y procedimientos del método de ensayo*

— Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;

— Descripción del método de ensayo utilizado;

— Línea celular utilizada, su origen, número de pases y confluencia de las células utilizadas para los ensayos;

— Particularidades del procedimiento de ensayo empleado;

— Número de repeticiones y réplicas utilizadas;

— Concentraciones del producto problema utilizadas (si son distintas de las recomendadas);

— Justificación de la elección del disolvente para cada producto problema;

— Duración de la exposición al producto problema (si es diferente de la recomendada);

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;

— Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;

— Referencia a la media y desviación típica (DT) de los testigos positivos históricos:

— Demostración de la competencia del laboratorio para utilizar el método de ensayo (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para la prueba de la competencia) o demostración de la utilización reproducible del método de ensayo a lo largo del tiempo.

*Resultados*

— Respecto a cada producto problema y sustancia testigo, y cada concentración sometida a ensayo, deben indicarse en un cuadro cada uno de los valores de DO por cada pocillo replicado, la media aritmética de los valores de DO de cada repetición independiente, la viabilidad celular porcentual de cada repetición independiente y la media aritmética final de la viabilidad celular porcentual y la desviación típica de las tres repeticiones;

— Resultados de los testigos de medio, de disolvente y positivo, que demuestren el cumplimiento de los criterios adecuados de aceptación del estudio;

— Descripción de otros efectos observados;

— Clasificación general derivada con referencia al modelo de asignación o a los criterios de decisión utilizados.

▼**M8**

*Discusión de los resultados*

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Quinta edición revisada. Nueva York y Ginebra: Publicaciones de las Naciones Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html

(2) Scott L, *et al.* (2010). A proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *in vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

(3) Mosmann T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to 7 Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(4) Takahashi Y, *et al.* (2008). Development of the Short Time Exposure (STE) Test: an *In Vitro* Eye Irritation Test Using SIRC Cells. *Toxicol. In Vitro* 22,760-770.

(5) Sakaguchi H, *et al.* (2011). Validation Study of the Short Time Exposure (STE) Test to Assess the Eye Irritation Potential of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 25,796-809.

(6) Kojima H, *et al.* (2013). Second-Phase Validation of Short Time Exposure Tests for Assessment of Eye Irritation Potency of Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 27, pp.1855-1869.

(7) ICCVAM (2013). Short Time Exposure (STE) Test Method Summary Review Document, NIH. Disponible en: [http://www.ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/STE-SRD-NICEATM-508.pdf].

(8) Capítulo B.5 del presente anexo, Irritación/corrosión ocular aguda.

(9) Saito K, *et al*. (2015). Predictive Performance of the Short Time Exposure Test for Identifying Eye Irritation Potential of Chemical Mixtures.

(10) Mikkelson TJ, Chrai SS and Robinson JR. (1973). Altered Bioavailability of Drugs in the Eye Due to Drug-Protein Interaction. *J. Pharm*. Sci.1648-1653.

(11) ECETOC (1998). Eye Irritation Reference Chemicals Data Bank. Technical Report (No 48. (2)), Bruselas, Bélgica.

(12) Gautheron P, *et al*. (1992). Bovine Corneal Opacity and Permeability Test: an *In Vitro* Assay of Ocular Irritancy. Fundam Appl *Toxicol.* 18, 442–449.

(13) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(14) OCDE (2017). Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 263). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

▼**M8**

*Apéndice*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (13).

**Sustancias de referencia**: Sustancias utilizadas como patrón para comparar con un producto problema. Las sustancias de referencia deben presentar las siguientes propiedades: i) un origen u orígenes coherentes y fiables; ii) similitud estructural y funcional con la clase de sustancias objeto del ensayo; iii) características físicas y químicas conocidas; iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos, y v) potencia conocida en la banda de la respuesta deseada.

**Enfoque ascendente**: Enfoque gradual utilizado para un producto problema del que se piensa que no requiere clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que no requieren clasificación (resultado negativo) frente a otros productos (resultado positivo).

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Irritación ocular**: Producción de cambios en el ojo, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que son totalmente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con «efectos reversibles en el ojo» y con la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

**Tasa de falsos negativos**: Proporción de todos los productos positivos identificados erróneamente como negativos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Tasa de falsos positivos**: Proporción de todos los productos negativos identificados erróneamente como positivos por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Peligro**: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**Testigo del medio**: Muestra replicada no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo para determinar si el disolvente interactúa con el sistema de ensayo.

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

**Sustancia de un solo componente**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**MTT**: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo.

**Sustancia de componentes múltiples**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración $\geq$ 10 % (p/p) y $<$ 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

▼**M8**

**DO**: Densidad óptica.

**Testigo positivo**: Réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Pertinencia**: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o clasifica correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (10).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (13).

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (10).

**Lesiones oculares graves**: Producción de lesiones tisulares en el ojo o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con «efectos irreversibles en el ojo» y con la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

**Control del disolvente/vehículo**: Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, incluido el disolvente o vehículo, y que se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con el producto problema y otras muestras testigo a fin de determinar la respuesta de base correspondiente a las muestras tratadas con el producto problema disuelto en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un testigo del medio en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Especificidad**: Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (13).

**Sustancia**: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

**Tensioactivo**: También denominado agente tensioactivo, es un producto, como un detergente, que puede reducir la tensión superficial de un líquido y, de este modo, permitir que forme espuma o penetre en los sólidos. También se conoce como agente humectante.

**Producto problema**: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

▼M8

**Estrategia de ensayos escalonados**: Estrategia de ensayo por fases, en la que se revisa toda la información existente sobre un producto problema, siguiendo un orden especificado, en un proceso de ponderación de las pruebas en cada escalón, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar al escalón siguiente. Si puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, no hace falta efectuar más ensayos. Si no puede establecerse la capacidad de irritación de un producto problema con la información disponible, se aplica un procedimiento gradual de ensayos con animales por fases hasta que pueda efectuarse una clasificación clara.

**Enfoque descendente**: Enfoque gradual utilizado para un producto problema del que se sospecha que causa lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que inducen lesiones oculares graves (resultado positivo) frente a otros productos (resultado negativo).

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas)**: Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de respuesta a emergencias) y al medio ambiente (1).

**Categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP**: Véase «Lesiones oculares graves».

**Categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP**: Véase «Irritación ocular».

**Sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP**: Productos no clasificados en las categorías 1 o 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (o en las categorías 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas).

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

▼M8

B.69. **MÉTODO DE ENSAYO CON EPITELIO HUMANO RECONSTRUIDO SIMILAR A LA CÓRNEA (EHRSC) PARA IDENTIFICAR PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO POR IRRITACIÓN OCULAR O LESIONES OCULARES GRAVES**

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 492 de la OCDE (2017). El término *lesiones oculares graves* se refiere a la producción de lesiones tisulares en el ojo o de una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación según la definición del Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA) de las Naciones Unidas (1) y del Reglamento (UE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) ([1]) de la Unión Europea. También de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP, el término *irritación ocular* se refiere a la producción de cambios en el ojo, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que son totalmente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación. Los productos problema que provocan lesiones oculares graves se clasifican en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, mientras que los que inducen irritación ocular se clasifican en la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Los productos problema no clasificados por irritación ocular o lesiones oculares graves se definen como aquellos que no cumplen los requisitos para la clasificación en las categorías 1 o 2 (2A o 2B) del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, es decir, se mencionan como «sin categoría» del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

2. La evaluación de la irritación ocular / lesiones oculares graves ha supuesto normalmente la utilización de animales de laboratorio [método de ensayo B.5 (2)]. La elección del método de ensayo más adecuado y el uso de este método de ensayo deben considerarse en el contexto del documento de orientación de la OCDE sobre un enfoque integrado de ensayos y evaluación de las lesiones oculares graves y la irritación ocular (39).

3. Este método de ensayo describe un procedimiento *in vitro* que permite la identificación de los productos (sustancias y mezclas) que no requieren clasificación y etiquetado por lesiones oculares graves o irritación ocular según el SGA de las Naciones Unidas y el CLP. Hace uso del epitelio humano reconstruido similar a la córnea (EHRSC), que imita bien las propiedades histológicas, morfológicas, bioquímicas y fisiológicas del epitelio de córnea humana. Otros cuatro métodos de ensayo *in vitro* se han validado, se han considerado científicamente válidos y se han adoptado como métodos de ensayo B.47 (3), B.48 (4), B.61 (5) y B.68 (6) para evaluar el parámetro de las lesiones oculares graves / irritación ocular en la salud humana.

4. En este método de ensayo se incluyen dos ensayos validados que utilizan modelos de EHRSC disponibles comercialmente. Se han realizado estudios de validación para evaluar la irritación ocular / lesiones oculares graves (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) utilizando el ensayo de irritación ocular (EIO) EpiOcular™ y el EIO con epitelio de córnea humana (ECH) SkinEthic™. En cada uno de ellos se utilizan como sistema de ensayo construcciones tisulares de EHRSC disponibles en el mercado, y se nombran en lo sucesivo como los métodos de referencia validados — MRV1 y MRV2, respectivamente. A partir de estos estudios de validación y de su revisión independiente por

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼**M8**

pares (9) (12) se llegó a la conclusión de que el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ son capaces de identificar correctamente los productos (tanto sustancias como mezclas) que no requieren clasificación y etiquetado por irritación ocular o lesiones oculares graves, según el SGA de las Naciones Unidas, y se recomendaron los ensayos como científicamente válidos para ese propósito (13).

5. Actualmente se acepta que, en un futuro próximo, ningún método de ensayo *in vitro* podrá sustituir completamente por sí solo al ensayo ocular de Draize *in vivo* (2) (14) para clasificar toda la gama de respuestas de lesiones oculares graves o de irritación ocular que pueden causar diferentes clases de productos. Sin embargo, unas combinaciones estratégicas de varios métodos de ensayo alternativos dentro de una estrategia de ensayos (escalonados), como es el enfoque descendente/ascendente, sí podrán sustituir completamente al ensayo ocular de Draize (15). El enfoque ascendente (15) está diseñado para ser utilizado cuando, sobre la base de la información existente, se espere que un producto no cause irritación ocular suficiente para exigir una clasificación, mientras que el enfoque descendente (15) está diseñado para ser utilizado cuando, sobre la base de la información existente, se espere que un producto cause lesiones oculares graves. Se recomiendan el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ para identificar los productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves de acuerdo con el SGA delas Naciones Unidas y del CLP (sin categoría) sin más ensayos, en el marco de una estrategia de ensayo como el enfoque ascendente/descendente sugerido por Scott *et al.*, por ejemplo como un primer paso de un enfoque ascendente o como uno de los últimos pasos de un enfoque descendente (15). Sin embargo, el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ no pretenden diferenciar entre la categoría 1 (lesiones oculares graves) y la categoría 2 (irritación ocular) del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Esta diferenciación deberá abordarse a otro escalón de la estrategia de ensayo (15). Por tanto, un producto problema del que se sepa que hay que adjudicarle una categoría de clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves con el EIO EpiOcular™ o el EIO con ECH SkinEthic™ requerirá ensayos adicionales (*in vitro* o *in vivo*) para llegar a una conclusión definitiva (sin categoría, categoría 2 o categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) utilizando, por ejemplo, los métodos de ensayo B.47, B.48, B.61 o B.68.

6. El objetivo del presente método de ensayo es describir el procedimiento utilizado a fin de evaluar el potencial de peligro para los ojos de un producto problema en función de su capacidad de inducir citotoxicidad en una construcción tisular de EHRSC, medida con el ensayo de MTT (16) (véase el punto 21). La viabilidad del tejido del EHRSC tras la exposición a un producto problema se determina comparándola con la de los tejidos tratados con la sustancia testigo negativo (% de viabilidad), y se utiliza a continuación para clasificar el potencial de peligro para los ojos del producto problema.

7. Se dispone de normas de comportamiento (17) que facilitan la validación de ensayos *in vitro* nuevos o modificados basados en el EHRSC, similares al EIO EpiOcular™ o al EIO con ECH SkinEthic™, de conformidad con los principios del documento de orientación n.º 34 de la OCDE (18), y tienen en cuenta la modificación oportuna de las directrices de ensayo TG 492 de la OCDE para su inclusión. La mutua aceptación de datos (MAD) con arreglo al acuerdo de la OCDE solo estará garantizada respecto a los ensayos validados de conformidad con las normas de comportamiento, si estos ensayos han sido revisados e incluidos en las correspondientes directrices de ensayo por la OCDE.

DEFINICIONES

8. En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

▼**M8**

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

9. Este método de ensayo se basa en construcciones tisulares de EHRSC tridimensionales disponibles en el mercado que se producen bien utilizando queratinocitos epidérmicos humanos primarios (es decir, OCL-200 en el caso de EpiOcular™) o células epiteliales de córnea humana inmortalizadas (es decir, ECH/S en el caso de SkinEthic™). Las construcciones tisulares de EHRSC OCL-200 de EpiOcular™ y ECH/S de SkinEthic™ son similares a la estructura tridimensional del epitelio de córnea *in vivo* y se producen a partir de células procedentes de la especie de interés (19) (20). Además, los ensayos miden directamente la citotoxicidad resultante de la penetración del producto a través de la córnea y la producción de lesiones celulares y tisulares; la respuesta citotóxica determina entonces el resultado global de lesiones oculares graves o irritación ocular *in vivo*. Pueden producirse lesiones celulares a través de varios modos de acción (véase el punto 20), pero la citotoxicidad desempeña un papel importante, si no el principal, en cuanto al mecanismo de la determinación de la respuesta global a un producto en forma de irritación ocular o lesiones oculares graves, y se manifiesta *in vivo* principalmente mediante opacidad de la córnea, iritis, enrojecimiento conjuntival y/o quemosis conjuntival, independientemente de los procesos fisicoquímicos que causan las lesiones tisulares.

10. En el estudio de validación en que se basa este método de ensayo se ha probado una amplia gama de productos, que abarcan una gran variedad de tipos químicos, clases químicas, pesos moleculares, log P, estructuras químicas, etc. La base de datos de validación del EIO EpiOcular™ contenía 113 productos en total, correspondientes a 95 grupos funcionales orgánicos diferentes según un análisis con la caja de herramientas QSAR (relación cuantitativa estructura-actividad) de la OCDE (8). La mayoría de estos productos representaban sustancias de un solo componente, pero también se incluyeron en el estudio diversas sustancias de componentes múltiples (incluidos 3 homopolímeros, 5 copolímeros y 10 cuasipolímeros). En términos de estado físico y categorías del SGA de la ONU y del CLP, los 113 productos sometidos a ensayo se distribuían como sigue: 13 líquidos de categoría 1, 15 sólidos de categoría 1, 6 líquidos de categoría 2A, 10 sólidos de categoría 2A, 7 líquidos de categoría 2B, 7 sólidos de categoría 2B, 27 líquidos sin categoría y 28 sólidos sin categoría (8). La base de datos de validación del EIO con ECH SkinEthic™ contenía 200 productos en total, correspondientes a 165 grupos funcionales orgánicos (8) (10) (11). La mayoría de estos productos representaban sustancias de un solo componente, pero también se incluyeron en el estudio diversas sustancias de componentes múltiples (incluidos 10 polímeros). En términos de estado físico y categorías del SGA de la ONU y del CLP, los 200 productos sometidos a ensayo se distribuían como sigue: 27 líquidos de categoría 1, 24 sólidos de categoría 1, 19 líquidos de categoría 2A, 10 sólidos de categoría 2A, 9 líquidos de categoría 2B, 8 sólidos de categoría 2B, 50 líquidos sin categoría y 53 sólidos sin categoría (10) (11).

11. Este método de ensayo es aplicable a sustancias y mezclas, y a sólidos, líquidos, semisólidos y ceras. Los líquidos pueden ser acuosos o no acuosos; los sólidos pueden ser solubles o insolubles en agua. Siempre que sea posible, los sólidos deben molerse hasta convertirse en polvo fino antes de su aplicación; no se requiere ningún otro tratamiento previo de la muestra. No se ha efectuado ningún estudio de validación con gases y aerosoles. Aunque no hay que descartar que los gases y aerosoles puedan estudiarse utilizando la tecnología del EHRSC, el actual método de ensayo no permite hacerlo.

12. Los productos problema que absorben la luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT (de forma natural o previo tratamiento) y los productos problema capaces de reducir directamente el colorante vital MTT (a formazano de MTT) pueden interferir con las mediciones de la viabilidad tisular y hacen necesario el uso de testigos adaptados para efectuar las correcciones oportunas. El tipo de testigos adaptados que puede ser necesario varía en función del tipo de interferencia producida por el producto problema y del procedimiento utilizado para cuantificar el formazano de MTT (véanse los puntos 36-42).

▼**M8**

13. Los resultados obtenidos en los estudios de prevalidación (21) (22) y de validación completa (8) (10) (11) han demostrado que tanto el EIO EpiOcular™ como el EIO con ECH SkinEthic™ son transferibles a laboratorios sin experiencia previa con la realización de los ensayos y que también pueden ser reproducibles en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios. Sobre la base de estos estudios, el nivel de reproducibilidad en términos de concordancia de las asignaciones que cabe esperar del EIO EpiOcular™ a partir de datos de 113 productos es del orden del 95 % en un mismo laboratorio y del 93 % en distintos laboratorios. El nivel de reproducibilidad en términos de concordancia de las asignaciones que cabe esperar del EIO con ECH SkinEthic™ a partir de datos de 120 productos es del orden del 92 % en un mismo laboratorio y del 95 % en distintos laboratorios.

14. El EIO EpiOcular™ puede utilizarse para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves con arreglo al sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el estudio de validación (8), el EIO EpiOcular™ tiene una exactitud global del 80 % (sobre 112 productos), una sensibilidad del 96 % (sobre 57 productos), una tasa de falsos negativos del 4 % (sobre 57 productos), una especificidad del 63 % (sobre 55 productos) y una tasa de falsos positivos del 37 % (sobre 55 productos), en comparación con los datos del ensayo de referencia con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5) (2) (14) clasificados según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Un estudio en el que se analizaron 97 formulaciones agroquímicas líquidas con el EIO EpiOcular™ demostró un comportamiento del método de ensayo con este tipo de mezclas similar al obtenido en el estudio de validación (23). Las 97 formulaciones se distribuían del siguiente modo: 21 de categoría 1, 19 de categoría 2A, 14 de categoría 2B y 43 sin categoría, clasificadas según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas sobre la base de los datos del ensayo de referencia con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5) (2) (14). Se obtuvo una exactitud global del 82 % (sobre 97 formulaciones), una sensibilidad del 91 % (sobre 54 formulaciones), una tasa de falsos negativos del 9 % sobre 54 formulaciones), una especificidad del 72 % (sobre 43 formulaciones) y una tasa de falsos positivos del 28 % (sobre 43 formulaciones) (23).

15. El EIO con ECH SkinEthic™ puede utilizarse para identificar productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves con arreglo al sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP. Teniendo en cuenta los datos obtenidos en el estudio de validación (10) (11), el EIO con ECH SkinEthic™ tiene una exactitud global del 84 % (sobre 200 productos), una sensibilidad del 95 % (sobre 97 productos), una tasa de falsos negativos del 5 % (sobre 97 productos), una especificidad del 72 % (sobre 103 productos) y una tasa de falsos positivos del 28 % (sobre 103 productos), en comparación con los datos del ensayo de referencia con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5) (2) (14) clasificados según el sistema de clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

16. Las tasas de falsos negativos obtenidas con ambos ensayos EHRSC, con sustancias o con mezclas, se sitúan dentro de la probabilidad global del 12 % de que se identifiquen los productos bien como de la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, bien como sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP por el ensayo ocular de Draize *in vivo*, en ensayos repetidos; esto se debe a la variabilidad dentro del ensayo que presenta el métododе forma inherente (24). Las tasas de falsos positivos obtenidas con ambos ensayos EHRSC, con sustancias o con mezclas, no son críticas en el contexto del presente método, ya que todos los productos problema que inducen una viabilidad celular igual o inferior a los valores límite establecidos (véase el punto 44) requieren nuevos análisis con otros métodos de ensayo *in vitro* o, como última opción, con conejos, en función de los requisitos normativos y de conformidad con una estrategia de evaluación secuencial dentro de un enfoque de ponderación de las pruebas. Estos métodos de ensayo pueden utilizarse con todos los tipos de productos, y un resultado negativo con ellos debe aceptarse para no clasificar un producto

▼M8

por irritación ocular ni lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP). Hay que consultar a las autoridades reguladoras competentes antes de utilizar el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ en un sistema de clasificación distinto del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

17. Una limitación de este método de ensayo es que no permite discriminar entre irritación ocular / efectos reversibles en el ojo (categoría 2) y lesiones oculares graves / efectos irreversibles en el ojo (categoría 1) según lo definido por el SGA de las Naciones Unidas y el CLP, ni entre irritantes oculares (categoría optativa 2A) e irritantes oculares leves (categoría optativa 2B), definidos por el SGA de las Naciones Unidas (1). A estos efectos, es necesario realizar más pruebas con otros métodos de ensayo *in vitro*.

18. El término «producto problema» se utiliza en el presente método de ensayo para referirse al objeto del ensayo ([1]) y no está relacionado con la aplicabilidad del método de ensayo EHRSC al ensayo de sustancias o mezclas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

19. El producto problema se aplica tópicamente a un mínimo de dos construcciones tisulares tridimensionales de EHRSC y se mide la viabilidad de los tejidos después de la exposición y de un período de incubación tras el tratamiento. Los tejidos de EHRSC se reconstruyen a partir de queratinocitos epidérmicos humanos primarios o de células epiteliales de córnea humana inmortalizadas, que se han cultivado durante varios días para formar un epitelio escamoso estratificado y muy diferenciado, similar al encontrado en la córnea humana. La construcción tisular de EHRSC del ensayo EpiOcular™ consiste en al menos tres capas viables de células y una superficie no queratinizada, con una estructura similar a la córnea, análoga a la que se encuentra *in vivo*. La construcción tisular de EHRSC del ensayo ECH SkinEthic™ consiste en al menos cuatro capas viables de células, con inclusión de células basales cilíndricas, células de transición aladas y células superficiales escamosas, similares a las del epitelio de córnea humana normal (20) (26).

20. La irritación ocular / lesiones oculares graves inducidas por un producto, que se manifiestan *in vivo* principalmente mediante opacidad de la córnea, iritis, enrojecimiento conjuntival y/o quemosis conjuntival, son el resultado de una cascada de sucesos que comienzan por la penetración del producto a través de la córnea y/o de la conjuntiva y la producción de lesiones a las células. Estas lesiones celulares pueden producirse a través de varios modos de acción, como los siguientes: lisis de la membrana celular (por ejemplo, por agentes tensioactivos, disolventes orgánicos); coagulación de macromoléculas (en particular, proteínas) (por ejemplo, por agentes tensioactivos, disolventes orgánicos, álcalis y ácidos); saponificación de lípidos (por ejemplo, por álcalis); y alquilación u otras interacciones covalentes con macromoléculas (por ejemplo, por hipocloritos, peróxidos y alquilantes) (15) (27) (28). Sin embargo, se ha demostrado que la citotoxicidad desempeña un papel importante, si no el principal, en cuanto al mecanismo de la determinación de la respuesta global a un producto en forma de irritación ocular o lesiones oculares graves, independientemente de los procesos fisicoquímicos que causan las lesiones tisulares (29) (30). Por otra parte, el potencial de

([1]) En junio de 2013, la reunión conjunta (Joint Meeting) de la OCDE acordó que, en la medida de lo posible, debe aplicarse ahora un uso más coherente del término «producto problema» para describir el objeto del ensayo en las directrices de ensayo de la OCDE nuevas y actualizadas.

▼**M8**

lesiones oculares graves / irritación ocular de un producto se determina principalmente por la magnitud de la lesión inicial (31), que se corresponde con la magnitud de la muerte celular (29) y con la magnitud de las respuestas posteriores y los resultados finales (32). Así pues, los irritantes leves generalmente afectan solo al epitelio superficial de la córnea, los irritantes suaves y moderados dañan principalmente el epitelio y el estroma superficial, y los irritantes intensos dañan el epitelio, el estroma profundo y a veces el endotelio de la córnea (30) (33). La medición de la viabilidad de la construcción tisular de EHRSC después de la exposición tópica a un producto problema a fin de identificar los productos que no requieren clasificación por lesiones oculares graves o irritación ocular (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) se basa en el supuesto de que todos los productos que provoquen lesiones oculares graves o irritación ocular provocarán citotoxicidad en el epitelio de la córnea y/o en la conjuntiva.

21. La viabilidad tisular del EHRSC se mide clásicamente mediante la conversión enzimática del colorante vital MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo; número CAS 298-93-1] por las células viables del tejido, que lo transforman en una sal azul de formazano de MTT, la cual se mide cuantitativamente tras su extracción de los tejidos (16). Los productos que no requieren clasificación y etiquetado de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP (sin categoría) se identifican como aquellos que no disminuyen la viabilidad tisular por debajo de un determinado umbral (es decir, viabilidad tisular > 60 %, en el EIO EpiOcular™ y en el EIOL con ECH SkinEthic™ ([1]), o > 50 % en el EIOS con ECH SkinEthic™ ([2])) (véase el punto 44).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

22. Antes de proceder al uso sistemático de los ensayos con EHRSC con fines normativos, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la asignación correcta de los quince productos para la prueba de la competencia que figuran en el cuadro 1. Estos productos se seleccionaron a partir de entre los productos utilizados en los estudios de validación de los MRV (8) (10) (11). En la selección se incluyen, en la medida de lo posible, productos que: i) tienen estados físicos diferentes; ii) abarcan toda la gama de respuestas *in vivo* de lesiones oculares graves / irritación ocular basadas en resultados de alta calidad obtenidos en el ensayo de referencia con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5) (2) (14) y utilizando el SGA de las Naciones Unidas (es decir, categorías 1, 2A, 2B, o sin categoría) (1) y el sistema de clasificación del CLP (es decir, categorías 1, 2 o sin categoría); iii) abarcan los diversos factores *in vivo* de la clasificación (24) (25); iv) son representativos de las clases químicas utilizadas en el estudio de validación (8) (10) (11); v) suponen una buena y amplia representación de grupos funcionales orgánicos (8) (10) (11); vi) tienen estructuras químicas bien definidas (8) (10) (11); vii) están coloreados o son reductores directos del MTT; viii) producen resultados reproducibles según los métodos de ensayo con EHRSC durante sus validaciones; ix) durante sus estudios de validación, los métodos de ensayo con EHRSC las han clasificado correctamente; x) abarcan toda la gama de respuestas *in vitro* sobre la base de los datos de alta calidad de los métodos de ensayo con EHRSC (de 0 a 100 % de viabilidad); xi) están disponibles en el comercio; y xii) no tienen asociados costes prohibitivos de adquisición ni de eliminación. En situaciones en las que un producto de la lista no esté disponible o no pueda utilizarse por otras razones justificadas, podrá utilizarse otro producto que cumpla los criterios descritos anteriormente, por ejemplo alguno de los productos utilizados en la validación del MRV. No obstante, tales desviaciones deben estar justificadas.

([1]) EIOL: EIO para líquidos con ECH SkinEthic™.
([2]) EIOS: EIO para sólidos con ECH SkinEthic™.

▼**M8**

*Cuadro 1*

**Lista de sustancias para la prueba de la competencia**

| Nombre químico | N.º CAS | Grupo funcional orgánico (1) | Estado físico | Viabilidad del MRV1 (%) (2) | Viabilidad del MRV2 (%) (3) | Asignación según el MRV | Reductor del MTT | Interf. color |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Categoría 1 *in vivo*** (4) | | | | | | | | |
| Tioglicolato de metilo | 2365-48-2 | Ésteres del ácido carboxílico; tioalcoholes | L | 10,9 ± 6,4 | 5,5 ± 7,4 | No puede hacerse ninguna asignación. | Sí (fuerte) | No |
| Acrilato de hidroxietilo | 818-61-1 | Acrilatos; alcoholes | L | 7,5 ± 4,7 (5) | 1,6 ± 1,0 | No puede hacerse ninguna asignación. | No | No |
| 2,5-Dimetil-2,5-hexanodiol | 110-03-2 | Alcoholes | S | 2,3 ± 0,2 | 0,2 ± 0,1 | No puede hacerse ninguna asignación. | No | No |
| Oxalato sódico | 62-76-0 | Ácidos oxocarboxílicos | S | 29,0 ± 1,2 | 5,3 ± 4,1 | No puede hacerse ninguna asignación. | No | No |
| **Categoría 2A *in vivo*** (4) | | | | | | | | |
| Di-D-gluconato de N,N″-bis(4-clorofenil)-3,12-diimino-2,4,11,13-tetraazatetradecano-diimidamida (solución acuosa al 20 %) (6) | 18472-51-0 | Haluros heterocíclicos aromáticos; haluros de arilo; grupos dihidroxilos; guanidinas | L | 4,0 ± 1,1 | 1,3 ± 0,6 | No puede hacerse ninguna asignación. | No | Sí (débil) |
| Benzoato sódico | 532-32-1 | Arilos; ácidos carboxílicos | S | 3,5 ± 2,6 | 0,6 ± 0,1 | No puede hacerse ninguna asignación. | No | No |
| **Categoría 2B *in vivo*** (4) | | | | | | | | |
| Dietil-toluamida | 134-62-3 | Benzamidas | L | 15,6 ± 6,3 | 2,8 ± 0,9 | No puede hacerse ninguna asignación. | No | No |
| 2,2-Dimetil-3-metilen-biciclo[2.2.1]heptano | 79-92-5 | Alcanos ramificados con carbono terciario; alquenos; biciclohептanos; carbociclos con puente; cicloalcanos | S | 4,7 ± 1,5 | 15,8 ± 1,1 | No puede hacerse ninguna asignación. | No | No |
| **Sin categoría *in vivo*** (4) | | | | | | | | |
| Etilsulfato de 1-etil-3-metilimidazolio | 342573-75-5 | Alcóxidos; sales de amonio; arilos; imidazoles; sulfatos | L | 79,9 ± 6,4 | 79,4 ± 6,2 | Sin categoría | No | No |

▼M8

| Nombre químico | N.º CAS | Grupo funcional orgánico (1) | Estado físico | Viabilidad del MRV1 (%) (2) | Viabilidad del MRV2 (%) (3) | Asignación según el MRV | Reductor del MTT | Interf. color |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Éter dicaprílico | 629-82-3 | Alcóxidos; éteres | L | 97,8 ± 4,3 | 95,2 ± 3,0 | Sin categoría | No | No |
| Butoxido de piperonilo | 51-03-6 | Alcóxidos; benzodioxoles; bencilos; éteres | L | 104,2 ± 4,2 | 96,5 ± 3,5 | Sin categoría | No | No |
| Aceite de ricino hidrogenado con polietilenglicol (PEG-40) | 61788-85-0 | Acilales; alcoholes; alilos; éteres | Viscoso | 77,6 ± 5,4 | 89,1 ± 2,9 | Sin categoría | No | No |
| 1-(4-Clorofenil)-3-(3,4-diclorofenil)urea | 101-20-2 | Haluros heterocíclicos aromáticos; haluros de arilo; derivados de la urea | S | 106,7 ± 5,3 | 101,9 ± 6,6 | Sin categoría | No | No |
| 2,2′-Metilen-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)fenol | 103597-45-1 | Alcanos ramificados con carbono cuaternario; carbociclos aromáticos fusionados; heterociclos saturados fusionados; compuestos quinonoides precursores; terc-butilos | S | 102,7 ± 13,4 | 97,7 ± 5,6 | Sin categoría | No | No |
| Tetrafluoroborato potásico | 14075-53-7 | Sales inorgánicas | S | 88,6 ± 3,3 | 92,9 ± 5,1 | Sin categoría | No | No |

Abreviaturas:

N.º CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service; SAG de las Naciones Unidas = Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (1); MRV1 = Método de referencia validado, EIO EpiOcular™; MRV2 = Método de referencia validado, EIO con ECH SkinEthic™; Interf. color = interferencia de color con la medición normal de la absorbancia [densidad óptica (DO)] del formazano de MTT.

(1) Grupo funcional orgánico asignado con arreglo a un análisis jerarquizado con la caja de herramientas 3.1 de la OCDE (8).

(2) Sobre la base de los resultados obtenidos en el EIO EpiOcular™ en el estudio europeo de validación de la irritación ocular por los cosméticos del LRUE del CEVMA (EIVS, Eye Irritation Validation Study) (8).

(3) Sobre la base de los resultados obtenidos en el EIO con ECH SkinEthic™ en el estudio de validación (10) (11).

(4) Sobre la base de los resultados obtenidos en el ensayo con ojos de conejo *in vivo* (método de ensayo B.5 / directrices TG 405 de la OCDE) (2) (14) y utilizando el SGA de las Naciones Unidas.

(5) Sobre la base de los resultados obtenidos en el estudio del Consorcio del CEFIC sobre la estrategia de ensayo de la irritación ocular *in vitro* (CON4EI).

(6) La clasificación como 2A o 2B depende de la interpretación del criterio del SGA de las Naciones Unidas para distinguir entre estas dos categorías, es decir, para generar una clasificación en la categoría 2A debe haber uno de tres o bien dos de tres animales con efectos el día 7. El estudio *in vivo* incluía tres animales. Todos los parámetros salvo la opacidad de la córnea en un solo animal se recuperaron hasta una puntuación de cero para el día 7 o antes. El único animal que no estaba recuperado completamente para el día 7 tuvo una puntuación de 1 en cuanto a la opacidad de la córnea (el día 7), con recuperación plena el día 9.

23. Como parte de la prueba de la competencia, se recomienda que el usuario verifique las propiedades de barrera de los tejidos tras su recepción, siguiendo las especificaciones del productor de la construcción tisular del EHRSC (véanse los puntos 25, 27 y 30). Este aspecto es particularmente importante si el envío de los tejidos implica grandes distancias o largos plazos. Una vez se haya establecido con éxito un método y se haya adquirido y demostrado la competencia para su uso, no será necesario efectuar esta verificación de forma sistemática. Sin embargo, cuando se utilice sistemáticamente un método, se recomienda seguir evaluando las propiedades de barrera a intervalos periódicos.

▼M8

PROCEDIMIENTO

24. Los ensayos que se acogen actualmente a este método de ensayo son el EIO EpiOcular™ y el EIO con ECH SkinEthic™ (9) (12) (13), mencionados como el método de referencia validado (MRV1 y MRV2, respectivamente). Se dispone de procedimientos normalizados de trabajo (PNT) para los métodos de ensayo con EHRSC y deben emplearse cuando se aplican y utilizan los métodos de ensayo en el laboratorio (34) (35). En los puntos siguientes y en el apéndice 2 se describen los principales componentes y procedimientos de los ensayos con EHRSC.

COMPONENTES DEL MÉTODO DE ENSAYO CON EHRSC

**Condiciones generales**

25. Deben utilizarse células pertinentes de origen humano para reconstruir el tejido tridimensional de epitelio similar a la córnea, tejido que debe estar compuesto de células progresivamente estratificadas pero no queratinizadas. La construcción tisular de EHRSC se prepara en piezas con una membrana sintética porosa a través de la cual los nutrientes pueden pasar a las células. En el epitelio reconstruido similar a la córnea deben estar presentes varias capas de células epiteliales viables y no queratinizadas. La construcción tisular de EHRSC debe tener la superficie epitelial en contacto directo con el aire para permitir la exposición tópica directa de los productos problema de forma similar a la de exposición *in viv*o del epitelio corneal. La construcción tisular de EHRSC debe constituir una barrera funcional con suficiente solidez para resistir la rápida penetración de sustancias citotóxicas de referencia como, por ejemplo, Tritón X-100 o dodecilsulfato sódico (DSS). La función de barrera debe demostrarse y puede evaluarse determinando bien el tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad tisular en un 50 % ($TE_{50}$) tras la aplicación de una sustancia de referencia a una concentración fija especificada [por ejemplo, 100 µl de Tritón X-100 al 0,3 % (v/v)], o bien la concentración a la que una sustancia de referencia reduce la viabilidad de los tejidos en un 50 % ($CI_{50}$) tras un tiempo fijo de exposición (por ejemplo, tratamiento de 30 minutos con 50 µl de DSS) (véase el punto 30). Las propiedades de aislamiento de la construcción tisular de EHRSC deben evitar que pase producto problema por la periferia del tejido viable, lo que podría reducir la calidad del modelo en cuanto a la exposición de la córnea. Las células de origen humano utilizadas para la construcción tisular de EHRSC deben estar libres de contaminación por bacterias, virus, micoplasmas y hongos. El proveedor debe comprobar la esterilidad de la construcción tisular en cuanto a la ausencia de contaminación por hongos y bacterias.

**Condiciones funcionales**

*Viabilidad*

26. El ensayo utilizado para cuantificar la viabilidad tisular es el ensayo de MTT (16). Las células viables del conjunto tisular de EHRSC reducen el colorante vital MTT a un precipitado azul de formazano de MTT, que se extrae a continuación del tejido utilizando isopropanol (o un disolvente similar). El formazano de MTT extraído puede cuantificarse utilizando una medición normal de la absorbancia (densidad óptica, DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC (36). La DO del disolvente de extracción solo debe ser suficientemente reducida, es decir, DO < 0,1. Los usuarios de la construcción tisular de EHRSC deben asegurarse de que cada lote utilizado de esta construcción cumple los criterios definidos en relación con el testigo negativo. En el cuadro 2 se indican los intervalos de aceptabilidad de los valores de DO de los testigos negativos correspondientes a los MRV. Como criterio de aceptación del testigo negativo, los usuarios de la espectrofotometría con HPLC/UPLC deben utilizar los intervalos de DO del testigo negativo que figuran en el cuadro 2. Hay que demostrar documentalmente en el informe del ensayo que los tejidos tratados con la sustancia testigo negativo son estables en cultivo (proporcionan unas mediciones similares de la viabilidad tisular) durante todo el tiempo de exposición del ensayo. El productor de tejidos debe seguir un procedimiento similar como parte del control de calidad para la aprobación de los lotes de tejidos, pero en este caso pueden ser de aplicación criterios de aceptación distintos de los

▼M8

especificados en el cuadro 2. El diseñador o proveedor de la construcción tisular de EHRSC debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límites superior e inferior) de los valores de DO de los testigos negativos (en las condiciones del método de ensayo del control de calidad).

*Cuadro 2*

**Intervalos de aceptabilidad de los valores de DO de los testigos negativos (para los usuarios del ensayo)**

| Ensayo | Límite inferior de aceptación | Límite superior de aceptación |
|---|---|---|
| EIO EpiOcular™ (OCL-200) — MRV1 (para los protocolos tanto de líquidos como de sólidos) | > 0,8 ([1]) | < 2,5 |
| EIO con ECH SkinEthic™ (ECH/S) — MRV2 (para los protocolos tanto de líquidos como de sólidos) | > 1,0 | ≤ 2,5 |

([1]) Este límite de aceptación contempla la posibilidad de ampliar el tiempo de envío/conservación (por ejemplo, > 4 días), del que se ha demostrado que no afecta al comportamiento del método de ensayo (37).

*Función de barrera*

27. La construcción tisular de EHRSC debe tener el suficiente espesor y solidez como para resistir la penetración rápida de sustancias citotóxicas de referencia, según la estimación, por ejemplo, mediante el $TE_{50}$ (tritón X-100) o mediante la $CI_{50}$ (DSS) (cuadro 3). La función de barrera de cada lote de construcción tisular de EHRSC utilizado debe estar demostrada por el diseñador o vendedor de esta construcción en el momento del suministro de los tejidos al usuario final (véase el punto 30).

*Morfología*

28. El examen histológico de la construcción tisular de EHRSC debe mostrar una estructura epitelial humana similar a la córnea (con al menos tres capas de células epiteliales viables y una superficie no queratinizada). Respecto a los MRV, la morfología adecuada ha sido establecida por el diseñador o proveedor y, por tanto, no tiene que ser demostrada de nuevo por el usuario del método de ensayo para cada lote de tejidos utilizado.

*Reproducibilidad*

29. Los resultados de los testigos positivos y negativos del método de ensayo deben demostrar su reproducibilidad a lo largo del tiempo.

*Control de calidad (CC)*

30. La construcción tisular de EHRSC solo debe utilizarse si el diseñador o proveedor demuestra que cada lote utilizado de esta construcción cumple los criterios definidos de aprobación de la producción, los más importantes de los cuales son los relativos a la viabilidad (punto 26) y a la función de barrera (punto 27). El diseñador o proveedor de la construcción tisular de EHRSC debe establecer un intervalo de aceptabilidad (límites superior e inferior) para las funciones de barrera medidas mediante el $TE_{50}$ o la $CI_{50}$ (véanse los puntos 25 y 26). En el cuadro 3 figura el intervalo de aceptabilidad del $TE_{50}$ o de la $CI_{50}$ utilizado como criterio de control de calidad para la aprobación de los lotes por el diseñador o proveedor de las construcciones tisulares de EHRSC (utilizadas en los MRV). El diseñador/proveedor de las construcciones tisulares de EHRSC debe facilitar a los usuarios de los métodos de ensayo los datos que demuestren el cumplimiento de todos los criterios para la aprobación de la producción, de manera que puedan incluir esta información en el informe de ensayo. Solo los resultados obtenidos con tejidos que cumplan todos estos criterios de aprobación de la producción pueden aceptarse para la asignación fiable de productos que no requieren clasificación y etiquetado por irritación ocular o lesiones oculares graves de conformidad con el SGA de la ONU y del CLP.

▼M8

*Cuadro 3*

**Criterio de control de calidad para la aprobación de los lotes**

| Ensayo | Límite inferior de aceptación | Límite superior de aceptación |
|---|---|---|
| EIO EpiOcular™ (OCL-200) — MRV1 [100 µl de tritón X-100 al 0,3 % (v/v)] | $TE_{50}$ = 12,2 min | $TE_{50}$ = 37,5 min |
| EIO con ECH SkinEthic™ (ECH/S) — MRV2 (tratamiento de 30 minutos con 50 µl de DSS) | $CI_{50}$ = 1 mg/ml | $CI_{50}$ = 3,2 mg/ml |

**Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo**

31. En cada tanda deben utilizarse al menos dos réplicas tisulares con cada producto problema y cada sustancia testigo. Se utilizan dos protocolos de tratamiento diferentes, uno para productos problema líquidos y otro para productos problema sólidos (34) (35). Con ambos métodos y protocolos, la superficie de la construcción tisular debe humedecerse utilizando solución salina amortiguadora con fosfato de Dulbecco libre de calcio y magnesio (DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$) antes de la aplicación de los productos problema, a fin de imitar las condiciones húmedas del ojo humano. El tratamiento de los tejidos se inicia con la exposición al producto o productos problema y a las sustancias testigo. Según ambos protocolos de tratamiento de los dos MRV, debe aplicarse una cantidad suficiente de producto problema o de sustancia testigo para cubrir uniformemente la superficie epitelial, evitando una dosis excesiva (véanse los puntos 32 y 33) (apéndice 2).

32. Los productos problema que pueden pipetearse a 37 °C o a temperaturas más bajas (utilizando una pipeta de desplazamiento positivo, en caso necesario) se tratan como líquidos en los MRV; de lo contrario deben tratarse como sólidos (véase el punto 33). En los MRV, el producto problema líquido se distribuye uniformemente sobre la superficie tisular (es decir, aplicación de un mínimo de 60 µl/$cm^2$) [véase el apéndice 2, (33) (34)]. Para garantizar la dosificación correcta del tejido deben evitarse en la medida de lo posible los efectos capilares (efectos de tensión superficial) que pueden producirse debido a los bajos volúmenes aplicados a la pieza (en la superficie tisular). Los tejidos tratados con productos problema líquidos se incuban durante 30 minutos en condiciones de cultivo normales (37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥ 95 % de HR). Al final del período de exposición, el producto problema líquido y las sustancias testigo deben retirarse con cuidado de la superficie tisular mediante un aclarado exhaustivo con DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ a temperatura ambiente. Este paso de aclarado va seguido de una inmersión tras la exposición en medio fresco a temperatura ambiente (para eliminar cualquier producto problema absorbido en el tejido) durante un plazo predeterminado que varía en función del MRV utilizado. Solo en el caso del MRV1 se aplica una incubación en medio fresco tras la exposición, en condiciones normales de cultivo, antes de realizar el ensayo del MTT [véase el apéndice 2, (34) (35)].

33. Los productos problema que no pueden pipetearse a temperaturas de hasta 37 °C se tratan como sólidas en los MRV. La cantidad de producto problema aplicado debe ser suficiente para cubrir toda la superficie tisular, es decir, debe utilizarse un mínimo de 60 mg/$cm^2$ (apéndice 2). Siempre que sea posible, los sólidos deben someterse a ensayo en forma de polvo fino. Los tejidos tratados con productos problema sólidos se incuban durante un período de tiempo predeterminado (dependiendo del MRV utilizado) en condiciones normales de cultivo [véase el apéndice 2, (34) (35)]. Al final del período de exposición, el producto problema sólido y las sustancias testigo deben retirarse con cuidado de la superficie tisular mediante un aclarado exhaustivo con DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ a temperatura ambiente. Este paso de aclarado va seguido de una inmersión tras la exposición en medio

▼M8

fresco a temperatura ambiente (para eliminar cualquier producto problema absorbido en el tejido) durante un plazo predeterminado que varía en función del MRV utilizado, y de una incubación en medio fresco tras la exposición, en condiciones normales de cultivo, antes de realizar el ensayo del MTT [véase el apéndice 2, (34) (35)].

34. En cada tanda deben incluirse testigos positivos y negativos en paralelo para demostrar que la viabilidad (determinada con el testigo negativo) y la sensibilidad (determinada con el testigo positivo) de los tejidos se encuentran dentro de intervalos de aceptación definidos sobre la base de datos históricos. El testigo negativo en paralelo también aporta la línea de base (100 % de viabilidad tisular) para calcular la viabilidad porcentual relativa de los tejidos tratados con el producto problema (% viabilidad$_{ensayo}$). La sustancia testigo positivo recomendada para los MRV es el acetato de metilo puro (n.º CAS 79-20-9, disponible en el comercio, por ejemplo, Sigma-Aldrich, n.º cat. 45997; líquido). Las sustancias testigo negativo recomendadas para el MRV1 y el MRV2 son $H_2O$ ultrapura y DPBS libre de $Ca^{2+}$/$Mg^{2+}$, respectivamente. Se trata de las sustancias testigo utilizadas en los estudios de validación de los MRV y son aquellas sobre las que se dispone de más datos históricos. El uso de otras sustancias testigo positivo o negativo adecuadas debe estar justificado científica y adecuadamente. Deben someterse a ensayo testigos positivos y negativos con el mismo protocolo o protocolos utilizados con los productos problema incluidos en la tanda (es decir, con líquidos y/o sólidos). Esta aplicación debe ir seguida de la exposición de tratamiento, el aclarado, una inmersión tras la exposición, y una incubación tras la exposición cuando proceda, tal como se describe para las tandas de los testigos en paralelo con los productos problema líquidos (véase el punto 32) o para las tandas de los testigos en paralelo con los productos problema sólidos (véase el punto 33), antes de realizar el ensayo de MTT (véase el punto 35) (34) (35). Un único conjunto de testigos negativos y positivos es suficiente para todos los productos problema del mismo estado físico (líquidos o sólidos) incluidos en la misma tanda.

**Medición de la viabilidad celular**

35. El ensayo del MTT es un método cuantitativo normalizado (16) que debe utilizarse para medir la viabilidad tisular según el presente método de ensayo. Es compatible con el uso de una construcción tisular tridimensional. El ensayo del MTT se realiza inmediatamente después del período de incubación tras la exposición. En los MRV, la muestra de la construcción tisular de EHRSC se coloca en 0,3 ml de solución de MTT a 1 mg/ml durante 180 ± 15 minutos en condiciones normales de cultivo. El colorante vital MTT es reducido a un precipitado azul de formazano de MTT por las células viables de la construcción tisular de EHRSC. A continuación se extrae del tejido el precipitado azul de formazano de MTT, utilizando un volumen adecuado de isopropanol (o un disolvente similar) (34) (35). En caso de tejidos sometidos a ensayo con productos problema líquidos la extracción debe hacerse tanto de la parte superior como de la parte inferior de los tejidos, mientras que en caso de tejidos sometidos a ensayo con productos problema sólidos y con líquidos coloreados la extracción debe hacerse solo de la parte inferior de los tejidos (para minimizar cualquier posible contaminación de la solución isopropanólica de extracción con cualquier producto problema que pueda haber permanecido en el tejido). Los tejidos sometidos a ensayo con productos problema líquidos que no son fáciles de lavar también pueden extraerse únicamente de la parte inferior del tejido. Las sustancias testigo positivo y negativo ensayadas en paralelo deben tratarse de forma similar al producto problema. El formazano de MTT extraído se puede cuantificar mediante una medición normal de la absorbancia (DO) a 570 nm utilizando un paso de banda máximo de ± 30 nm o mediante un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPL (véase el punto 42) (11) (36).

▼**M8**

36. Las propiedades ópticas del producto problema o su acción química sobre el MTT pueden interferir con la medición del formazano de MTT, lo que daría lugar a una estimación falsa de la viabilidad del tejido. Ciertos productos problema pueden interferir con la medición del formazano de MTT mediante una reducción directa del MTT a formazano de MTT azul, y/o mediante interferencia de color si el producto problema absorbe, de forma natural o debido a los procedimientos del tratamiento, en la misma gama de DO que el formazano de MTT (es decir, a alrededor de 570 ± 30 nm). Deben realizarse controles previos antes de proceder a los ensayos para permitir la identificación de posibles reductores del MTT y/o de productos que interfieran con el color, y deben utilizarse controles adicionales para detectar y corregir posibles interferencias de tales productos problema (véanse los puntos 37-41). Esto es especialmente importante cuando un producto problema específico no se elimina completamente de la construcción tisular de EHRSC por el lavado o cuando penetra en el epitelio similar a la córnea y está presente, por tanto, en dicha construcción cuando se realiza el ensayo del MTT. En el caso de los productos problema que absorben luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT (naturalmente o después de un tratamiento), que no son compatibles con la medición normal de la absorbancia del formazano de MTT debido a una interferencia excesiva, es decir, una fuerte absorción a 570 ± 30 nm, puede emplearse un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT (véanse los puntos 41 y 42) (11) (36). En los PNT de los MRV puede encontrarse una descripción pormenorizada de la forma de detectar y corregir la reducción directa del MTT y las interferencias debidas a agentes colorantes (34) (35). En los apéndices III y IV se presentan, respectivamente, diagramas de flujo ilustrativos con orientaciones sobre cómo identificar y tratar los reductores directos del MTT y/o los productos que interfieren con el color en el caso del MRV1 y del MRV2, respectivamente.

37. Para identificar la posible interferencia de los productos problema que absorben la luz en el mismo intervalo que el formazano de MTT (naturalmente o después de un tratamiento) y decidir sobre la necesidad de utilizar testigos adicionales, el producto problema se añade al agua y/o al isopropanol y se incuba durante un tiempo adecuado a temperatura ambiente [véase el apéndice 2, (34) (35)]. Si el producto problema en el agua y/o isopropanol absorbe suficiente luz en el intervalo de 570 ± 20 nm con el MRV1 (véase el apéndice 3), o si se obtiene una solución coloreada cuando se mezcla el producto problema con agua con el MRV2 (véase el apéndice 4), se supone que el producto problema interfiere con la medición normal de la absorbancia del formazano de MTT y deben aplicarse otros testigos de colorante o bien debe utilizarse un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC, en cuyo caso no serían necesarios esos otros testigos (véanse los puntos 41 y 42 y los apéndices III y IV) (34) (35). Cuando se realiza la medición normal de la absorbancia (DO), cada producto problema que interfiere debe aplicarse en al menos dos réplicas de tejido viable, que se someten al procedimiento de ensayo completo, pero se incuban con medio en lugar de con la solución de MTT durante la fase de incubación del MTT para generar un testigo de color inespecífico en los tejidos vivos ($NSC_{vivo}$) (34) (35). El control $NSC_{vivo}$ debe realizarse al mismo tiempo que el ensayo del producto problema coloreado y, en caso de ensayos múltiples, debe llevarse a cabo un control $NSC_{vivo}$ independiente con cada ensayo realizado (en cada tanda) debido a la variabilidad biológica inherente de los tejidos vivos. La viabilidad tisular real se calcula de la manera siguiente: el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con solución de MTT (% $viabilidad_{ensayo}$) menos el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% $NSC_{vivo}$), es decir, viabilidad tisular real = [% $viabilidad_{ensayo}$] - [% $NSC_{vivo}$].

38. Para identificar los reductores directos del MTT, cada producto problema debe añadirse a una solución de MTT recién preparada. Se añade una cantidad adecuada de producto problema a una solución de MTT y la mezcla se incuba durante aproximadamente 3 horas en condiciones normales de cultivo

▼**M8**

(véanse los apéndices III y IV) (34) (35). Si la mezcla de MTT que contiene el producto problema (o la suspensión en caso de productos problema insolubles) se pone azul/violeta, se supone que el producto problema reduce directamente el MTT y debe aplicarse otro testigo funcional con construcciones tisulares de EHRSC inviables, con independencia de que se utilice la medición normal de la absorbancia (DO) o un procedimiento de espectrofotometría con HPLC/UPLC. Este control funcional adicional emplea tejidos muertos que solo poseen actividad metabólica residual, pero que absorben y retienen el producto problema de forma similar a los tejidos viables. Los tejidos muertos del MRV1 se preparan por exposición a bajas temperaturas («muertos por congelación»). Los tejidos muertos del MRV2 se preparan mediante incubación prolongada (por ejemplo, al menos 24 ± 1 horas) en agua seguida de su almacenamiento a baja temperatura («muertos en agua»). Cada producto problema reductor del MTT se aplica al menos a dos réplicas de tejido muerto que se someten a todo el procedimiento de ensayo, para generar una reducción inespecífica del MTT (NSMTT) (34) (35). Un solo control NSMTT es suficiente por producto problema, independientemente del número realizado de ensayos o tandas independientes. La viabilidad tisular real se calcula de la manera siguiente: el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos sometidos al reductor del MTT (% viabilidad$_{ensayo}$) menos el porcentaje de reducción inespecífica del MTT obtenido con los tejidos muertos expuestos al mismo reductor del MTT, calculado en relación con el testigo negativo aplicado en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSMTT); es decir, viabilidad tisular real = [% viabilidad$_{ensayo}$] - [% NSMTT].

39. Los productos problema que se identifiquen como causantes de interferencia de color (véase el punto 37) y de reducción directa del MTT (véase el punto 38) también requerirán una tercera serie de testigos cuando se realice la medición normal de la absorbancia (DO), aparte de los controles NSMTT y NSC$_{vivo}$ que se describen en los puntos anteriores. Esto es generalmente así en el caso de los productos problema de color oscuro que absorben luz en el intervalo de 570 ± 30 nm (p. ej., azul, violeta, negro) porque su color intrínseco impide la evaluación de su capacidad para reducir directamente el MTT, tal como se describe en el punto 38. Esto obliga, por defecto, a utilizar controles NSMTT junto con controles NSC$_{vivo}$. Los productos problema para los que se aplican controles tanto NSMTT como NSC$_{vivo}$ pueden ser absorbidos y retenidos por los tejidos vivos y muertos. Por tanto, el control NSMTT puede facilitar la corrección no solo de la posible reducción directa del MTT por el producto problema, sino también dela interferencia de color derivada de la absorción y retención del producto problema por los tejidos muertos. Esto podría dar lugar a una doble corrección de la interferencia de color, puesto que el control NSC$_{vivo}$ ya corrige la interferencia de color derivada de la absorción y retención del producto problema por los tejidos vivos. Para evitar una posible doble corrección de la interferencia de color, es necesario aplicar un tercer control relativo al color inespecífico con tejidos muertos (NSC$_{muerto}$) (véanse los apéndices III y IV) (35). En este control adicional, el producto problema se aplica en al menos dos réplicas de tejido muerto, que se someten a todo el procedimiento de ensayo, pero se incuban con medio en lugar de con una solución de MTT durante la fase de incubación del MTT. Un solo control NSC$_{muerto}$ es suficiente por producto problema cualquiera que sea el número realizado de ensayos o tandas independientes, pero debe aplicarse al mismo tiempo que el control NSMTT y, en la medida de lo posible, con el mismo lote de tejidos. La viabilidad tisular real se calcula de la manera siguiente: el porcentaje de viabilidad tisular obtenido con los tejidos vivos expuestos al producto problema (% viabilidad$_{ensayo}$) menos el % NSMTT menos el % NSC$_{vivo}$ más el porcentaje de color inespecífico obtenido con los tejidos muertos expuestos al producto problema que interfiere e incubados con medio sin MTT, calculados en relación con el testigo negativo aplicado en paralelo con el ensayo que se está corrigiendo (% NSC$_{muerto}$), es decir, viabilidad tisular real = [% viabilidad$_{ensayo}$] - [% NSMTT] - [% NSC$_{vivo}$] + [% NSC$_{muerto}$].

▼M8

40. Es importante señalar que las interferencias de reducción inespecífica del MTT y de color inespecífico pueden aumentar la DO (cuando se realizan mediciones normales de absorbancia) del extracto tisular por encima del intervalo de linealidad del espectrofotómetro y que la reducción inespecífica del MTT puede también aumentar el área del pico de formazano de MTT (cuando se realizan mediciones mediante espectrofotometría con HPLC/UPLC) del extracto tisular por encima del intervalo de linealidad del espectrofotómetro. Sobre esta base, es importante que cada laboratorio determine el intervalo de linealidad de DO / área bajo el pico de su espectrofotómetro con, p. ej., formazano de MTT (n.º CAS 57360-69-7), procedente de una fuente comercial como Sigma-Aldrich (n.º cat. M2003), antes de iniciar el ensayo de los productos problema con fines normativos.

41. La medición normal de la absorbancia (DO) utilizando un espectrofotómetro es adecuada para evaluar los reductores directos del MTT y los productos problema que interfieren con el color, cuando la interferencia observada con la medición de formazano de MTT no es demasiado fuerte (es decir, las DO de los extractos tisulares obtenidos con el producto problema sin corrección alguna de la reducción directa del MTT y/o de la interferencia de color se encuentran dentro del intervalo lineal del espectrofotómetro). No obstante, los resultados correspondientes a productos problema que muestran un % NSMTT o un % $NSC_{vivo} \geq 60$ % (MRV1 y MRV2 con el protocolo para líquidos) o 50 % (MRV2 con el protocolo para sólidos) del testigo negativo deben tomarse con precaución, ya que este valor es el umbral utilizado en los MRV para distinguir los productos clasificados de los no clasificados (véase el punto 44). Sin embargo, la absorbancia (DO) no puede medirse normalmente cuando la interferencia con la medición del formazano de MTT es demasiado fuerte (es decir, lleva a valores de DO de los extractos tisulares del ensayo sin corregir que quedan fuera del intervalo lineal del espectrofotómetro). Los productos problema de color o los productos problema que se colorean en contacto con el agua o el isopropanol que interfieren excesivamente con la medición normal de la absorbancia (DO) del formazano de MTT pueden evaluarse todavía utilizando la espectrofotometría con HPLC/UPLC (véanse los apéndices III y IV). Esto es así porque el sistema de HPLC/UPLC permite separar el formazano de MTT del producto problema antes de su cuantificación (36). Por esta razón, los controles $NSC_{vivo}$ o $NSC_{muerto}$ no son necesarios nunca si se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC, independientemente del producto sometido a ensayo. No obstante, deben utilizarse controles NSMTT si se sospecha que el producto problema reduce directamente el MTT (siguiendo el procedimiento descrito en el punto 38). También deben utilizarse controles NSMTT en caso de productos problema con color (intrínseco o de aparición cuando se pone en el agua) que obstaculiza la evaluación de su capacidad de reducir directamente el MTT, como se describe en el punto 38. Cuando se utiliza la espectrofotometría con HPLC/UPLC para medir el formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular se calcula como porcentaje del área bajo el pico de formazano de MTT obtenido con tejidos vivos expuestos al producto problema en relación con el pico de formazano de MTT obtenido con el testigo negativo en paralelo. En el caso de productos problema capaces de reducir directamente el MTT, la viabilidad tisular real se calcula de la siguiente manera: (% $viabilidad_{ensayo}$) menos % NSMTT, según se describe en la última frase del apartado 38. Por último, hay que señalar que no pueden evaluarse mediante los métodos de ensayo con EHRSC los reductores directos de MTT o los reductores directos de MTT que también interfieren con el color, que se mantienen en los tejidos después del tratamiento y reducen el MTT de manera tan intensa que llevan a unas DO (si se utiliza la medición normal de la DO) o a unas áreas bajo el pico (si se utiliza la espectrofotometría con UPLC/HPLC) de los extractos tisulares analizados que quedan fuera del intervalo de linealidad del espectrofotómetro, aunque se espera que estos casos se produzcan solo en muy raras situaciones.

42. La espectrofotometría con HPLC/UPLC puede utilizarse para medir el formazano de MTT con todos los tipos de productos problema (con color, sin color, reductores del MTT, no reductores del MTT) (11) (36). Debido a la diversidad de sistemas de espectrofotometría con HPLC/UPLC, no es posible que cada usuario consiga exactamente las mismas condiciones del sistema.

▼M8

Antes de utilizar un sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC para cuantificar el formazano de MTT en extractos tisulares, ha de demostrarse que en sí es apto a tal fin mediante el cumplimiento de los criterios de aceptación respecto a un conjunto de parámetros normales de aptitud sobre la base de los descritos en el documento de orientación de la Food and Drug Administration de EE. UU. para la industria sobre la validación de métodos bioanalíticos (36) (38). Estos parámetros clave y sus criterios de aceptación figuran en el apéndice 5. Una vez se hayan cumplido los criterios de aceptación definidos en el apéndice 5, se considera que el sistema de espectrofotometría con HPLC/UPLC es apto y está listo para medir el formazano de MTT en las condiciones experimentales descritas en el presente método de ensayo.

**Criterios de aceptación**

43. Para cada tanda que utilice lotes de tejido de EHRSC que pasen el control de calidad (véase el punto 30), los tejidos tratados con la sustancia testigo negativo deben presentar una DO que refleje la calidad de los tejidos que hayan pasado por las fases de transporte y recepción y por todos los procesos del protocolo, y no deben estar fuera de los límites históricos establecidos en el cuadro 2 (véase el punto 26). Del mismo modo, los tejidos tratados con la sustancia testigo positivo, es decir, acetato de metilo, deben mostrar una viabilidad tisular media < 50 % en relación con el testigo negativo en el MRV1, en los protocolos de líquidos o de sólidos, y ≤ 30 % (protocolo de líquidos), o ≤ 20 % (protocolo de sólidos) en relación con el testigo negativo en el MRV2, lo que refleja la capacidad de los tejidos para responder a un producto problema irritante en las condiciones del método de ensayo (34) (35). La variabilidad entre réplicas tisulares de productos problema y sustancias testigo debe respetar los límites aceptados [es decir, la diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %, o la desviación típica (DT) entre tres réplicas tisulares no debe exceder del 18 %]. Si el testigo negativo o el testigo positivo incluido en una tanda queda fuera de los intervalos aceptados, se considera que la tanda no es apta y debe repetirse. Si la variabilidad entre las réplicas tisulares de un producto problema está fuera del intervalo aceptado, debe considerarse que el ensayo no es apto y el producto problema debe someterse a ensayo de nuevo.

**Interpretación de los resultados y modelo de asignación**

44. Deben utilizarse los valores de DO / áreas bajo el pico obtenidos con los extractos tisulares replicados para cada producto problema a fin de calcular la viabilidad tisular media porcentual (media entre las réplicas tisulares) normalizadas con referencia al testigo negativo, cuyo valor se fija en el 100 %. En el cuadro 4 se indica el valor porcentual de corte de la viabilidad tisular para identificar los productos problema que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y CLP). Así pues, los resultados deben interpretarse como sigue:

— Se dice que el producto problema no requiere clasificación y etiquetado de acuerdo con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP (sin categoría) si el valor porcentual medio de la viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras la exposición es superior (>) al valor porcentual de corte establecido de la viabilidad tisular, como se muestra en el cuadro 4. En este caso, no es necesario realizar más ensayos con otros métodos de ensayo.

▼M8

— Si el valor porcentual medio de la viabilidad tisular después de la exposición y la incubación tras la exposición es inferior o igual (≤) al valor porcentual de corte establecido de la viabilidad tisular, no se podrá hacer ninguna asignación, como se muestra en el cuadro 4. En este caso, será necesario llevar a cabo ensayos adicionales con otros métodos de ensayo, ya que los métodos de ensayo con EHRSC muestran un número determinado de resultados positivos falsos (véanse los puntos 14-15) y no pueden resolverse entre las categorías 1 y 2 del SGA de la ONU y del CLP (véase el punto 17).

*Cuadro 4*

**Modelos de asignación según la clasificación del SGA de las Naciones Unidas y del CLP**

| MRV | Sin categoría | No puede hacerse ninguna asignación. |
|---|---|---|
| MRV1 — EIO EpiOcular™ (con ambos protocolos) | Viabilidad tisular media > 60 % | Viabilidad tisular media ≤ 60 % |
| MRV2 — EIO con ECH SkinEthic™ (con el protocolo de líquidos) | Viabilidad tisular media > 60 % | Viabilidad tisular media ≤ 60 % |
| MRV2 — EIO con ECH SkinEthic™ (con el protocolo de sólidos) | Viabilidad tisular media > 50 % | Viabilidad tisular media ≤ 50 % |

45. Un solo ensayo compuesto al menos por dos réplicas tisulares debe ser suficiente para un producto problema, si el resultado es claro. Sin embargo, en casos de resultados dudosos, como el de mediciones no concordantes de las réplicas y/o el de un porcentaje de viabilidad tisular media igual al 60 ± 5 % (MRV1 y MRV2 con el protocolo para líquidos) o 50 ± 5 % (MRV2 con el protocolo para sólidos), debería plantearse la conveniencia de efectuar un segundo ensayo, así como un tercero en caso de resultados discordantes entre los dos primeros.

46. A fin de mejorar el comportamiento global del método de ensayo con determinados tipos de mezclas (véase el punto 14), en relación con estos tipos de mezclas podrán tenerse en cuenta diferentes valores porcentuales de corte de la viabilidad tisular que distingan entre productos problema clasificados y no clasificados, siempre que sea apropiado y justificable. Los productos de referencia pueden ser útiles para evaluar el potencial de irritación ocular o de lesiones oculares graves de productos problema desconocidos o clases de productos, o para evaluar el potencial relativo de toxicidad ocular de un producto clasificado en una gama específica de respuestas positivas.

DATOS E INFORME

**Datos**

47. Los datos de los distintos tejidos replicados de una tanda (por ejemplo, valores de DO o de área bajo el pico de formazano de MTT y valores porcentuales calculados de la viabilidad tisular relativos al producto problema y a los testigos, y la asignación final del método de ensayo con EHRSC) deben presentarse en forma de tabla para cada producto problema, incluidos los datos de ensayos repetidos, según proceda. Además, debe indicarse el valor porcentual medio de la viabilidad tisular y la diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares (si n = 2 tejidos replicados) o la DT (si n ≥ 3 tejidos replicados) para cada producto problema y testigo. Se deben notificar respecto a cada producto problema las eventuales interferencias observadas que provoque este con la medición del formazano de MTT a través de la reducción directa del MTT o por interferencias de color.

**Informe del ensayo**

48. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

▼**M8**

*Producto problema*

Sustancias de un solo componente

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Estado físico, volatilidad, pH, log P, peso molecular, clase química y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes para la realización del estudio, según su disponibilidad;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible.

Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas

— Caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), en la medida de lo posible;

— Estado físico y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes para la realización del estudio, según su disponibilidad;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible.

*Sustancias testigo positivo y negativo*

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Estado físico, volatilidad, peso molecular, clase química y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes para la realización del estudio, según su disponibilidad;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación del uso de un testigo negativo distinto del $H_2O$ ultrapura o de la solución DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$, si procede;

— Justificación del uso de un testigo positivo distinto del acetato de metilo puro, si procede;

— Referencia a los resultados de los testigos positivos y negativos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación de las tandas.

*Información referente al promotor y al laboratorio*

— Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio.

— *Construcción tisular de EHRSC y protocolo utilizados (justificación de las opciones elegidas, si procede)*

▼**M8**

*Condiciones del método de ensayo*

— Construcción tisular de EHRSC utilizada, incluido el número de lote;

— Longitud de onda y paso de banda (si procede) utilizados para cuantificar el formazano de MTT y el intervalo de linealidad del dispositivo de medición (p. ej., espectrofotómetro);

— Descripción del método utilizado para cuantificar el formazano de MTT;

— Descripción del sistema utilizado de espectrofotometría con HPLC/UPLC, si procede;

— Información justificativa completa sobre la construcción tisular de EHRSC concreta utilizada, incluido su comportamiento. Aquí deben incluirse, entre otras cosas:

  i) Control de calidad de la viabilidad (proveedor);

  ii) Viabilidad en las condiciones del método de ensayo (usuario);

  iii) Control de calidad de la función de barrera;

  iv) Morfología, si se dispone de ella;

  v) Reproducibilidad y capacidad de asignación;

  vi) Otros controles de calidad (CC) de la construcción tisular de EHRSC, si se dispone de ellos;

— Referencia a datos históricos de la construcción tisular de EHRSC. Aquí deben incluirse, entre otras cosas, la aceptabilidad de los datos de CC con referencia a datos anteriores del lote;

— Declaración de que el laboratorio ha demostrado su competencia para el uso del método de ensayo, antes de su uso sistemático, mediante el ensayo de los productos utilizados para la prueba de la competencia.

*Criterios de aceptación de las tandas y del ensayo*

— Valores medios e intervalos de aceptación de los testigos positivos y negativos a partir de datos históricos;

— Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares con respecto a los testigos positivos y negativos;

— Variabilidad aceptable entre las réplicas tisulares correspondientes a cada producto problema.

*Procedimiento de ensayo*

— Particularidades del procedimiento de ensayo empleado;

— Dosis utilizadas del producto problema y de las sustancias testigo;

— Duración y temperatura de los períodos de exposición, inmersión tras la exposición e incubación tras la exposición (en su caso);

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo;

▼M8

— Indicación de los controles utilizados con productos problema que son reductores directos del MTT y/o colorantes, en su caso;

— Número de réplicas tisulares utilizadas con cada producto problema y testigo (testigo positivo, testigo negativo, NSMTT, $NSC_{vivo}$ y $NSC_{muerto}$, en su caso);

*Resultados*

— Cuadros de datos de cada producto problema y testigo, con las mediciones de cada tanda (includios los experimentos repetidos, en su caso) y cada réplica, incluido el valor de DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el porcentaje de viabilidad tisular, el porcentaje medio de viabilidad tisular, las diferencias entre las réplicas tisulares o las desviaciones típicas, y asignación final;

— En su caso, los resultados de los controles utilizados en relación con los productos problema que son reductores directos del MTT o coloreados, incluido el valor de DO o el área bajo el pico de formazano de MTT, el % NSMTT, el % $NSC_{vivo}$, el % $NSC_{muerto}$, las diferencias entre las réplicas tisulares o las desviaciones típicas, porcentaje final correcto de viabilidad tisular, y asignación final;

— Resultados obtenidos con el producto o productos problema y sustancias testigo en relación con los criterios definidos de aceptación de las tandas y del ensayo;

— Descripción de otros efectos observados como, por ejemplo, coloración de los tejidos por un producto problema coloreado;

*Discusión de los resultados*

*Conclusión*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Naciones Unidas (2015). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA) ST/SG/AC.10/30/Rev. 6, sexta edición revisada, Nueva York y Ginebra: Naciones Unidas. Disponible en: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev6sp.pdf.

(2) Capítulo B.5 del presente anexo, Irritación/corrosión ocular aguda.

(3) Capítulo B.47 del presente anexo, Método de ensayo de la opacidad y permeabilidad de la córnea de bovino para identificar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación por irritación ocular ni lesiones oculares graves.

(4) Capítulo B.48 del presente anexo, Método de ensayo de ojo de pollo aislado para identificar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación.

(5) Capítulo B.61 del presente anexo, Método de ensayo de pérdida de fluoresceína para detectar agentes corrosivos e irritantes intensos para los ojos.

▼**M8**

(6) Capítulo B.68 del presente anexo, Método de ensayo *in vitro* con exposición de breve duración para detectar: i) productos que provocan lesiones oculares graves y ii) productos que no requieren clasificación por irritación ocular o lesiones oculares graves.

(7) Freeman, S.J., Alépée N., Barroso, J., Cole, T., Compagnoni, A., Rubingh, C., Eskes, C., Lammers, J., McNamee, P., Pfannenbecker, U., Zuang, V. (2010). Prospective Validation Study of Reconstructed Human Tissue Models for Eye Irritation Testing. *ALTEX* 27, Special Issue 2010,261-266.

(8) LRUE del CEVMA (2014). The EURL ECVAM - Cosmetics Europe prospective validation study of Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE)-based test methods for identifying chemicals not requiring classification and labelling for serious eye damage/eye irritation: Validation Study Report. EUR 28125 EN; doi:10.2787/41680. Disponible en: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC100280.

(9) Comité Consultivo Científico del CEVMA (2014). ESAC Opinion on the EURL ECVAM Eye Irritation Validation Study (EIVS) on EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE and a related Cosmetics Europe study on HPLC/UPLC-spectrophotometry as an alternative endpoint detection system for MTT-formazan. ESAC Opinion No 2014-03 of 17 November 2014; EUR 28 173 EN; doi: 10.2787/043697. Disponible en: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103702.

(10) Alépée, N., Leblanc, V., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Lelièvre, D, Meloni, M., Nardelli, L., Roper, C.S, Santirocco, E., Toner, F., Van Rompay, A., Vinall, J., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory validation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using liquid chemicals. *Toxicol. In Vitro* 31, 43-53.

(11) Alépée, N., Adriaens, E., Grandidier, M.H., Meloni, M., Nardelli, L., Vinall, C.J., Toner, F., Roper, C.S, Van Rompay, A.R., Leblanc, V., Cotovio, J. (2016). Multi-laboratory evaluation of SkinEthic HCE test method for testing serious eye damage/eye irritation using solid chemicals and overall performance of the test method with regard to solid and liquid chemicals testing. *Toxicol. In Vitro* 34, 55-70.

(12) Comité Consultivo Científico del CEVMA (2016). ESAC Opinion on the SkinEthic™ Human Corneal Epithelium (HCE) Eye Irritation Test (EIT). ESAC Opinion No 2016-02 of 24 June 2016; EUR 28 175 EN; doi: 10.2787/390390. Disponible en: http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103704.

(13) LRUE del CEVMA (2016). Recommendation on the Use of the Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Serious Eye Damage/Eye Irritation According to UN GHS. (Manuscript in Preparation).

(14) Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O. (1944). Methods for the Study of Irritation and Toxicity of Substances Applied Topically to the Skin and Mucous Membranes. Journal of *Pharmacol. and Exp. Therapeutics* 82, 377-390.

(15) Scott, L., Eskes, C., Hoffmann, S., Adriaens, E., Alépée, N., Bufo, M., Clothier, R., Facchini, D., Faller, C., Guest, R., Harbell, J., Hartung, T., Kamp, H., Le Varlet, B., Meloni, M., McNamee, P., Osborne, R., Pape, W., Pfannenbecker, U., Prinsen, M., Seaman, C., Spielman, H., Stokes, W., Trouba, K., Van den Berghe, C., Van Goethem, F., Vassallo, M., Vinardell, P., Zuang, V. (2010). A Proposed Eye Irritation Testing Strategy to Reduce and Replace *In Vivo* Studies Using Bottom-Up and Top-Down Approaches. *Toxicol. In Vitro* 24, 1-9.

▼**M8**

(16) Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

(17) OCDE (2016) Series on Testing and Assessment, No. 216. Performance Standards for the Assessment of Proposed Similar or Modified *In Vitro* Reconstructed Human Cornea-Like Epithelium (RhCE) Test Methods for Identifying Chemicals not Requiring Classification and Labelling for Eye Irritation or Serious Eye Damage, Based on the Validated Reference Methods EpiOcular™ EIT and SkinEthic™ HCE EIT described in TG 492. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(18) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No 34: Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(19) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Hayden, P., Kubilus, J., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2011). Development of the EpiOcular™ Eye Irritation Test for Hazard Identification and Labelling of Eye Irritating Chemicals in Response to the Requirements of the EU Cosmetics Directive and REACH Legislation. *Altern. Lab. Anim.* 39, 339-364.

(20) Nguyen, D.H., Beuerman, R.W., De Wever, B., Rosdy, M. (2003). Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for in vitro toxicology. In: Salem, H., Katz, S.A. (Eds), Alternative Toxicological Methods, CRC Press, pp. 147-159.

(21) Pfannenbecker, U., Bessou-Touya, S., Faller, C., Harbell, J., Jacob, T., Raabe, H., Tailhardat, M., Alépée, N., De Smedt, A., De Wever, B., Jones, P., Kaluzhny, Y., Le Varlet, B., McNamee, P., Marrec-Fairley, M., Van Goethem, F. (2013). Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the EpiOcular™ reconstituted Human Tissue Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 619-626.

(22) Alépée, N., Bessou-Touya, S., Cotovio, J., de Smedt, A., de Wever, B., Faller, C., Jones, P., Le Varlet, B., Marrec-Fairley, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., van Goethem, F., McNamee, P. (2013). Cosmetics Europe Multi-Laboratory Pre-Validation of the SkinEthic™ Reconstituted Human Corneal Epithelium Test Method for the Prediction of Eye Irritation. *Toxicol. In Vitro* 27, 1476-1488.

(23) Kolle, S.N., Moreno, M.C.R., Mayer, W., van Cott, A., van Ravenzwaay, B., Landsiedel, R. (2015). The EpiOcular™ Eye Irritation Test is the Method of Choice for *In Vitro* Eye Irritation Testing of Agrochemical Formulations: Correlation Analysis of EpiOcular™ Eye Irritation Test and BCOP Test Data to UN GHS, US EPA and Brazil ANIVSA Classifications. *Altern. Lab. Anim.* 43, 1-18.

(24) Adriaens, E., Barroso, J., Eskes, C., Hoffmann, S., McNamee, P., Alépée, N., Bessou-Touya, S., De Smedt, A., De Wever, B., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Zuang, V. (2014). Retrospective Analysis of the Draize Test for Serious Eye Damage/Eye Irritation: Importance of Understanding the *In Vivo* Endpoints Under UN GHS/EU CLP for the Development and Evaluation of *In Vitro* Test Methods. *Arch. Toxicol.* 88, 701-723.

(25) Barroso, J., Pfannenbecker, U., Adriaens, E., Alépée, N., Cluzel, M., De Smedt, A., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Templier, M., McNamee, P. (2017). Cosmetics Europe compilation of historical serious eye damage/eye irritation *in vivo* data analysed by drivers of classification to support the selection of chemicals for development and evaluation of alternative methods/strategies: the Draize eye test Reference Database (DRD). *Arch. Toxicol.* 91, 521-547.

(26) Meloni, M., De Servi, B., Marasco, D., Del Prete, S. (2011). Molecular mechanism of ocular surface damage: Application to an *in vitro* dry eye model on human corneal epithelium. *Molecular Vision* 17, 113-126.

▼**M8**

(27) Hackett, R.B., McDonald, T.O. (1991). Eye Irritation. In *Advances in Modern Toxicology: Dermatoxicology* Marzulli F.N.and Maibach H.I. (Eds.), 4th Edition, pp. 749–815. Washington, DC, USA: Hemisphere Publishing Corporation.

(28) Fox, D.A., Boyes, W.K. (2008). Toxic Responses of the Ocular and Visual System. In Cassaret and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Klaassen C.D.(Ed.), 7th Edition, pp. 665–697. Withby, ON, Canada: McGraw-Hill Ryerson.

(29) Jester, J.V., Li, H.F., Petroll, W.M., Parker, R.D., Cavanagh, H.D., Carr, G.J., Smith, B., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant Induced Corneal Injury Correlates with Cell Death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 922–936.

(30) Maurer, J.K., Parker, R.D., Jester, J.V. (2002). Extent of Corneal Injury as the Mechanistic Basis for Ocular Irritation: Key Findings and Recommendations for the Development of Alternative Assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36, 106-117.

(31) Jester, J.V., Li, L., Molai, A., Maurer, J.K. (2001). Extent of Corneal Injury as a Mechanistic Basis for Alternative Eye Irritation Tests. *Toxicol. In Vitro* 15, 115–130.

(32) Jester, J.V., Petroll, W.M., Bean, J., Parker, R.D., Carr, G.J., Cavanagh, H.D., Maurer, J.K. (1998). Area and Depth of Surfactant-Induced Corneal Injury Predicts Extent of Subsequent Ocular Responses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 2610–2625.

(33) Jester, J.V. (2006). Extent of Corneal Injury as a Biomarker for Hazard Assessment and the Development of Alternative Models to the Draize Rabbit Eye Test. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 25, 41–54.

(34) EpiOcular™ EIT SOP, Version 8 (March 05, 2013). EpiOcular™ EIT for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponible en: [https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index].

(35) SkinEthic™ HCE EIT SOP, Version 1. (July 20, 2015). SkinEthic™ HCE Eye Irritation Test (EITL for Liquids, EITS for Solids) for the Prediction of Acute Ocular Irritation of Chemicals. Disponible en: https://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/beta/index.cfm/methodsAndProtocols/index.

(36) Alépée, N., Barroso, J., De Smedt, A., De Wever, B., Hibatallah, J., Klaric, M., Mewes, K.R., Millet, M., Pfannenbecker, U., Tailhardat, M., Templier, M., McNamee, P. (2015). Use of HPLC/UPLC-Spectrophotometry for Detection of Formazan in *In Vitro* Reconstructed Human Tissue (RhT)-Based Test Methods Employing the MTT-Reduction Assay to Expand their Applicability to Strongly Coloured Test Chemicals. *Toxicol. In Vitro* 29, 741-761.

(37) Kaluzhny, Y., Kandárová, H., Handa, Y., DeLuca, J., Truong, T., Hunter, A., Kearney, P., d'Argembeau-Thornton, L., Klausner, M. (2015). EpiOcular™ Eye Irritation Test (EIT) for Hazard Identification and Labeling of Eye Irritating Chemicals: Protocol Optimization for Solid Materials and Extended Shipment Times. *Altern. Lab Anim.* 43, 101-127.

(38) US FDA (2001). Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. May 2001. Disponible en: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf.

(39) OCDE (2017) Guidance Document on an Integrated Approaches on Testing and Assessment for Serious Eye Damage and Eye irritation. Series on Testing and Assessment No 263. ENV Publications, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Exactitud**: Grado de coincidencia entre los resultados obtenidos con el método de ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del método de ensayo y es un aspecto de su «pertinencia». Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un método de ensayo (18).

**Producto de referencia**: Producto utilizado como patrón para comparar con un producto problema. Los productos de referencia deben presentar las siguientes propiedades: i) tener un origen u orígenes coherentes y fiables para su identificación y caracterización; ii) presentar similitud estructural, funcional o en cuanto a la clase química o de producto con respecto al producto o productos que se somete a ensayo; iii) características fisicoquímicas conocidas; iv) datos de apoyo sobre los efectos conocidos; y v) potencia conocida en la banda de la respuesta deseada.

**Enfoque ascendente**: Enfoque gradual utilizado para un producto problema del que se sospecha que no requiere clasificación y etiquetado por irritación ocular o lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que no requieren clasificación y etiquetado (resultado negativo) frente a otros productos (resultado positivo).

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**Concordancia**: Véase «Exactitud».

**Córnea**: Parte transparente delantera del globo ocular que cubre el iris y la pupila y permite el paso de la luz al interior.

**CV**: Coeficiente de variación.

**Desv.**: Desviación.

**EIO**: Ensayo de irritación ocular.

**LRUE del CEVMA**: Laboratorio de referencia de la Unión Europea para los métodos alternativos a la experimentación con animales

**Irritación ocular**: Producción de cambios en el ojo, como consecuencia de la aplicación de un producto problema en la superficie anterior del ojo, que son totalmente reversibles en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con «efectos reversibles en el ojo» y con la categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

**$TE_{50}$**: Tiempo de exposición necesario para reducir la viabilidad tisular en un 50 % tras la administración de un producto de referencia a una concentración fija determinada.

**Tasa de falsos negativos**: Proporción de todas las sustancias positivas identificadas erróneamente como negativas por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Tasa de falsos positivos**: Proporción de todas las sustancias negativas identificadas erróneamente como positivas por un método de ensayo. Es uno de los indicadores del comportamiento del método de ensayo.

**Peligro**: Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**ECH**: Epitelio de córnea humana SkinEthic™.

▼**M8**

**HPLC**: Cromatografía líquida de alta resolución.

**$CI_{50}$**: Concentración a la que una sustancia de referencia reduce la viabilidad tisular en un 50 % tras un tiempo fijo de exposición (por ejemplo, tratamiento de 30 minutos con DSS).

**Dosis excesiva**: Cantidad de producto problema aplicada a la construcción tisular de EHRSC que supera a la cantidad necesaria para cubrir completa y uniformemente la superficie epitelial.

**Efectos irreversibles en el ojo**: Véase «Lesiones oculares graves».

**LIC**: Límite inferior de cuantificación.

**Log P**: Logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua.

**Mezcla**: Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

**Sustancia de un solo componente**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**Sustancia de componentes múltiples**: Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración $\geq$ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

**MTT**: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio; bromuro de tetrazolio de azul de tiazolilo.

**Testigo negativo**: Muestra que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que no induce una respuesta positiva en el sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo, y se utiliza para determinar el 10 % de viabilidad tisular.

**No clasificados**: Productos no clasificados por irritación ocular (categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP, categorías 2A o 2B del del SGA de las Naciones Unidas) o por lesiones oculares graves (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP). Intercambiable con «sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP».

**$NSC_{muerto}$**: Color inespecífico en tejidos muertos.

**$NSC_{vivo}$**: Color inespecífico en tejidos vivos.

**NSMTT**: Reducción inespecífica del MTT.

**DO**: Densidad óptica.

**Normas de comportamiento**: Normas, basadas en un método de referencia validado que se ha considerado científicamente válido, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un método de ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluyen: i) los componentes fundamentales del método de ensayo; ii) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y iii) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el método de ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (18).

▼**M8**

**Testigo positivo**: Muestra que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva en el sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras testigo. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Pertinencia**: Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un método de ensayo (18).

**Fiabilidad**: Medida del grado en que un método de ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (18).

**Ensayo de sustitución**: Ensayo que se diseña para sustituir un ensayo utilizado de forma sistemática y aceptado para la identificación de peligros o la evaluación de riesgos, y del que se ha determinado que proporciona una protección equivalente o mejorada de la salud humana o del medio ambiente, según corresponda, respecto al ensayo aceptado, en relación con todas las situaciones de ensayo y todos los productos posibles (18).

**Reproducibilidad**: Coincidencia entre los resultados obtenidos en el ensayo repetido del mismo producto problema utilizando el mismo protocolo de ensayo (véase «Fiabilidad») (18).

**Efectos reversibles en el ojo**: Véase «Irritación ocular».

**EHRSC**: Epitelio humano reconstruido similar a la córnea.

**Tanda**: Una tanda consiste en el ensayo de uno o más productos problema al mismo tiempo que un testigo negativo y un testigo positivo.

**DT**: Desviación típica.

**Sensibilidad**: Proporción de todos los productos problema activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (18).

▼M8

**Lesiones oculares graves**: Producción de lesiones tisulares en el ojo o una degradación física severa de la vista, como consecuencia de la aplicación de una sustancia problema en la superficie anterior del ojo, y que no es totalmente reversible en los 21 días siguientes a la aplicación. Intercambiable con «efectos irreversibles en el ojo» y con la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

**Procedimientos normalizados de trabajo (PNT)**: Procedimientos escritos oficiales que describen en detalle cómo deben llevarse a cabo las operaciones de laboratorio corrientes y las específicas de cada ensayo. Son exigidas por las BPL.

**Especificidad**: Proporción de todos los productos negativos o inactivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un método de ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un método de ensayo (18).

**Sustancia**: Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

**Ensayo**: Un solo producto problema sometido a ensayo al mismo tiempo con un mínimo de dos réplicas tisulares como se define en los correspondientes PNT.

**Viabilidad tisular**: Parámetro que mide la actividad total de una población celular en un tejido reconstruido como su capacidad de reducir el colorante vital MTT que, según el parámetro que se mida y el diseño del ensayo utilizado, se corresponde con el número total y/o la vitalidad de las células vivas.

**Enfoque descendente**: Enfoque gradual utilizado para un producto del que se sospecha que causa lesiones oculares graves, que comienza con la determinación de los productos que inducen lesiones oculares graves (resultado positivo) frente a otros productos (resultado negativo).

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Estrategia de ensayos escalonados**: Estrategia de ensayo por fases, que utiliza los métodos de ensayo de forma secuencial. En cada escalón se revisa toda la información existente sobre un producto problema, en un proceso de ponderación de las pruebas, a fin de determinar si se dispone de información suficiente para tomar una decisión sobre la clasificación de un peligro, antes de pasar al escalón siguiente de la estrategia. Si puede establecerse la potencia o el potencial de peligro de un producto problema sobre la base de la información disponible en un escalón dado, no hace falta efectuar más ensayos (18).

**LSC**: Límite superior de cuantificación.

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas)**: Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (1).

**Categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP**: Véase «Lesiones oculares graves».

**Categoría 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP**: Véase «Irritación ocular».

**Sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP**: Productos que no cumplen los requisitos de clasificación en las categorías 1 o 2 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP (o en las categorías 2A o 2B del SGA de las Naciones Unidas). Intercambiable con «no clasificados».

**UPLC**: Cromatografía líquida de ultraalta resolución.

▼**M8**

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

**Método de ensayo válido**: Método de ensayo del que se considera que tiene suficiente pertinencia y fiabilidad con un fin específico y que se basa en principios sólidos desde el punto de vista científico. Un método de ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado (18).

**Método de ensayo validado**: Método de ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (18).

**MRV**: Método de referencia validado.

**MRV1**: El EIO EpiOcular™ se conoce como el método de referencia validado 1.

**MRV2**: El EIO con ECH SkinEthic™ se conoce como el método de referencia validado 2.

**Ponderación de los datos**: Proceso de consideración de los aspectos favorables y desfavorables de los distintos elementos de información a efectos de alcanzar y confirmar una conclusión en cuanto al peligro potencial de una sustancia problema.

▼M8

*Apéndice 2*

PRINCIPALES COMPONENTES DE LOS ENSAYOS CON EHRSC PARA IDENTIFICAR PRODUCTOS QUE NO REQUIEREN CLASIFICACIÓN Y ETIQUETADO POR IRRITACIÓN OCULAR O LESIONES OCULARES GRAVES

| Componentes del ensayo | EIO EpiOcula™ (MRV1) | | EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2) | |
|---|---|---|---|---|
| Protocolos | Líquidos (pipeteables a 37 ± 1 °C o temperaturas más bajas durante 15 minutos) | Sólidos (no pipeteables) | Líquidos y viscosos (pipeteables) | Sólidos (no pipeteables) |
| Superficie del modelo | 0,6 $cm^2$ | 0,6 $cm^2$ | 0,5 $cm^2$ | 0,5 $cm^2$ |
| Número de réplicas tisulares | Al menos dos | Al menos dos | Al menos dos | Al menos dos |
| Control previo en relación con la interferencia de color | 50 µl + 1 ml $H_2O$ durante 60 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥ 95 % HR (productos problema no coloreados), o<br>50 µl + 2 ml de isopropanol mezclado durante 2-3 h a temperatura ambiente (productos problema coloreados)<br>→ Si la DO del producto problema a 570 ± 20 nm, tras la sustracción de la DO correspondiente al isopropanol o al agua es > 0,08 (lo que corresponde aproximadamente al 5 % de la DO media del testigo negativo), deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo. | 50 mg + 1 ml $H_2O$ durante 60 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥ 95 % HR (productos problema no coloreados)<br>y/o<br>50 mg + 2 ml de isopropanol mezclado durante 2-3 h a temperatura ambiente (productos problema coloreados y no coloreados)<br>→ Si la DO del producto problema a 570 ± 20 nm, tras la sustracción de la DO correspondiente al isopropanol o al agua es > 0,08 (lo que corresponde aproximadamente al 5 % de la DO media del testigo negativo), deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo. | 10 µl + 90 µl $H_2O$ mezclada durante 30 ± 2 min, a la temperatura ambiente (18-28°C).<br>→ Si el producto problema es de color, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo. | 10 mg + 90 µl de $H_2O$ mezclados durante 30 ± 2 min a temperatura ambiente<br>→ Si el producto problema es de color, deben utilizarse testigos adaptados con tejido vivo. |

▼M8

| Componentes del ensayo | EIO EpiOcula™ (MRV1) | | EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2) | |
|---|---|---|---|---|
| Control previo en relación con la reducción directa del MTT | 50 µl + 1 ml de solución MTT 1 mg/ml durante 180 ± 15 min. a 37 ± 2°C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥95 % de humedad relativa<br>→ Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación<br>(se utilizan como testigo negativo 50 µl de agua desionizada estéril en solución de MTT) | 50 mg + 1 ml de solución MTT 1 mg/ml durante 180 ± 15 min a 37 ± 2°C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥95 % de humedad relativa<br>→ Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto por congelación<br>(se utilizan como testigo negativo 50 µl de agua desionizada estéril en solución de MTT) | 30 µl + 300 µl de solución MTT 1 mg/ml durante 180 ± 15 min a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa<br>→ Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto en agua.<br>(se utilizan como testigo negativo 30 µl de agua desionizada estéril en solución de MTT) | 30 mg + 300 µl de solución MTT 1 mg/ml durante 180 ± 15 min a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa<br>→ Si la solución se pone de color azul/morado, deben utilizarse testigos adaptados con tejido muerto en agua.<br>(se utilizan como testigo negativo 30 µl de agua desionizada estéril en solución de MTT) |
| Pretratamiento | 20 µl de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$<br>durante 30 ± 2 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa, protegidos de la luz. | 20 µl de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$<br>durante 30 ± 2 min a 37 ± 2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa, protegidos de la luz. | - | - |
| Dosis de tratamiento y aplicación | 50 µl (83,3 µl/$cm^2$) | 50 mg (83,3 mg/$cm^2$) utilizando una herramienta calibrada (por ejemplo, una cucharada rasa calibrada para tener 50 mg de cloruro de sodio). | 10 µl de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ + 30 ± 2 µl (60 µl/$cm^2$)<br>En caso de productos viscosos, se utiliza una malla de nailon. | 30 µl de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ + 30 ± 2 mg (60 mg/$cm^2$) |
| Tiempo y temperatura de la exposición | 30 min (± 2 min)<br>en medio de cultivo<br>a 37 ± 2°C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa | 6 horas (± 0,25 h)<br>en medio de cultivo<br>a 37 ± 2°C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa | 30 min (± 2 min)<br>en medio de cultivo<br>a 37 ± 2°C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa | 4 horas (± 0,1 h)<br>en medio de cultivo<br>a 37 ± 2°C, 5 ± 1 % de $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa |
| Lavado a temperatura ambiente | 3 veces en 100 ml de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ | 3 veces en 100 ml de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ | 20 ml de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ | 25 ml de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$ |
| Inmersión tras la exposición | 12 min (± 2 min) a temperatura ambiente en medio de cultivo | 25 min (± 2 min) a temperatura ambiente en medio de cultivo | 30 min (±2 min) a 37°C, 5 % $CO_2$, 95 % de humedad relativa en medio de cultivo | 30 min (± 2 min) a temperatura ambiente en medio de cultivo |

▼M8

| Componentes del ensayo | EIO EpiOcula™ (MRV1) | | EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2) | |
|---|---|---|---|---|
| Incubación tras la exposición | 120 min (± 15 min) en medio de cultivo a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa | 18 h (± 0,25 h) en medio de cultivo a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa | Ninguna | 18 h (± 0,5 h) en medio de cultivo a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa |
| Testigo negativo | 50 µl de $H_2O$<br>Sometido a ensayo al mismo tiempo | 50 µl de $H_2O$<br>Sometido a ensayo al mismo tiempo | 30 ± 2 µl de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$<br>Sometido a ensayo al mismo tiempo | 30 ± 2 µl de DPBS libre de $Ca^{2+}/Mg^{2+}$<br>Sometido a ensayo al mismo tiempo |
| Testigo positivo | 50 µl de acetato de metilo<br>Sometido a ensayo al mismo tiempo | 50 µl de acetato de metilo<br>Sometido a ensayo al mismo tiempo | 30 ± 2 µl de acetato de metilo<br>Sometido a ensayo al mismo tiempo | 30 ± 2 µl de acetato de metilo<br>Sometido a ensayo al mismo tiempo |
| Solución de MTT | 300 µl con 1 mg/ml | 300 µl con 1 mg/ml | 300 µl con 1 mg/ml | 300 µl con 1 mg/ml |
| Tiempo y temperatura de incubación del MTT | 180 min (± 15 min) a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa | 180 min (± 15 min) a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa | 180 min (± 15 min) a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa | 180 min (± 15 min) a 37 ±2 °C, 5 ± 1 % $CO_2$, ≥ 95 % de humedad relativa |
| Disolvente de extracción | 2 ml de isopropanol<br>(extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza perforando el tejido) | 2 ml de isopropanol<br>(extracción de la parte inferior de la pieza perforando el tejido) | 1,5 ml de isopropanol<br>(extracción de la parte superior y de la parte inferior de la pieza) | 1,5 ml de isopropanol<br>(extracción de la parte inferior de la pieza) |
| Tiempo y temperatura de extracción | 2-3 h con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente o una noche a 4-10 °C | 2-3 h con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente o una noche a 4-10 °C | 4 h con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente o una noche a 4-10 °C | Al menos 2 h con agitación (~ 120 rpm) a temperatura ambiente |
| Lectura de la DO | 570 nm (550 - 590 nm)<br>sin filtro de referencia | 570 nm (550 - -590 nm)<br>sin filtro de referencia | 570 nm (540 - 600 nm)<br>sin filtro de referencia | 570 nm (540 - 600 nm)<br>sin filtro de referencia |
| Control de calidad del tejido | Tratamiento con 100 µl de tritón X-100 al 0,3 % (v/v)<br>12,2 min ≤ $TE_{50}$ ≤ 37,5 min | Tratamiento con 100 µl de tritón X-100 al 0,3 % (v/v)<br>12,2 min ≤ $TE_{50}$ ≤ 37,5 min | 30 min de tratamiento con DSS (50 µl)<br>1,0 mg/ml ≤ $CI_{50}$ ≤ 3,5 mg/ml | 30 min de tratamiento con DSS (50 µl)<br>1,0 mg/ml ≤ $CI_{50}$ ≤ 3,2 mg/ml |

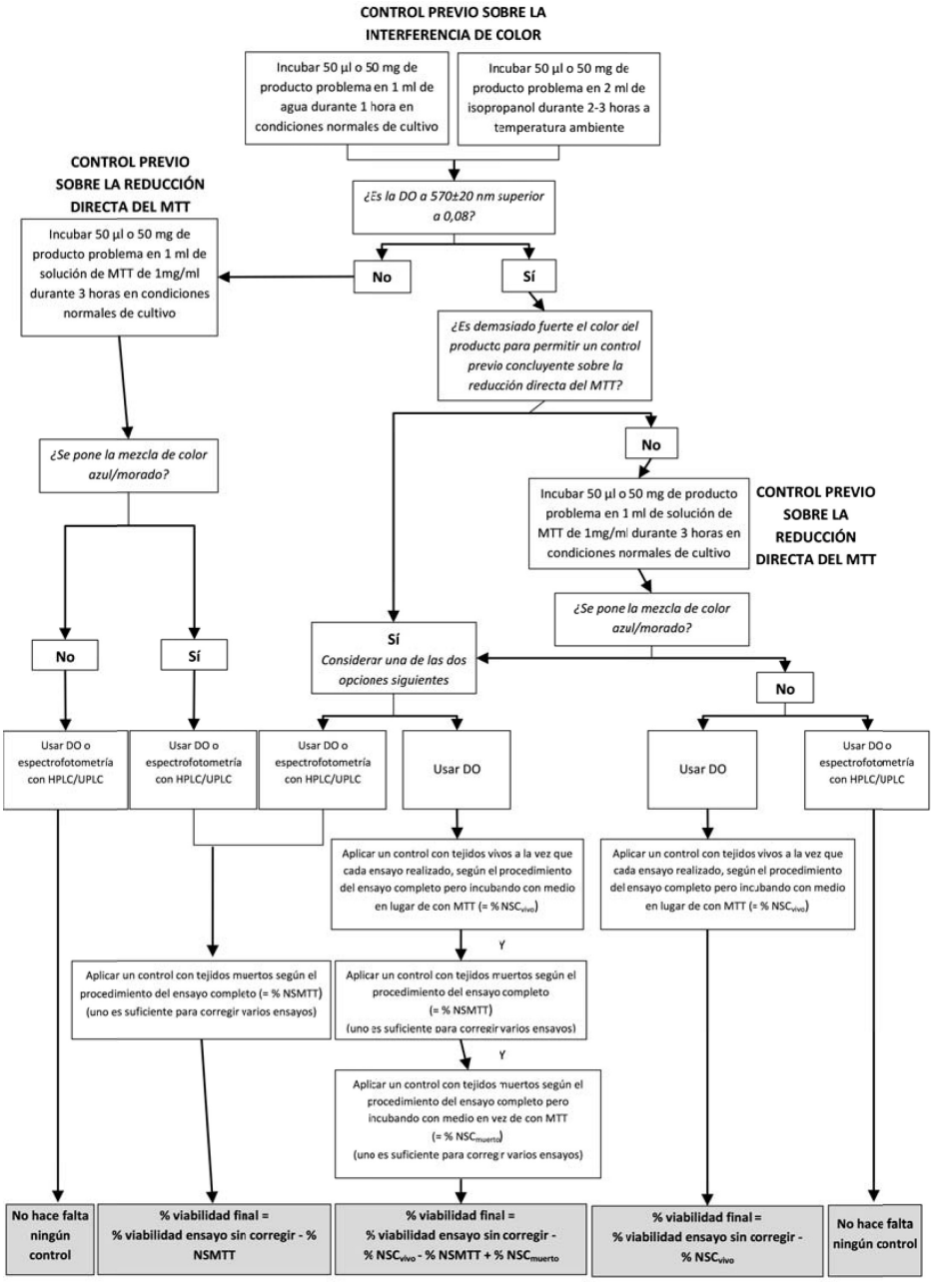
▼M8

| Componentes del ensayo | EIO EpiOcula™ (MRV1) | | EIO con ECH SkinEthic™ (MRV2) | |
|---|---|---|---|---|
| Criterios de aceptación | 1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo debe ser > 0,8 y < 2,5.<br>2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 30 min con el testigo positivo, expresada en % del testigo negativo, debe ser < 50 %.<br>3. La diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %. | 1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo debe ser > 0,8 y < 2,5.<br>2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 6 horas con el testigo positivo, expresada en % del testigo negativo, debe ser < 50 %.<br>3. La diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %. | 1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo debe ser > 1,0 y ≤ 2,5.<br>2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 30 min con el testigo positivo, expresada en % del testigo negativo, debe ser ≤ 30 %.<br>3. La diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %. | 1. La DO media de las réplicas tisulares tratadas con el testigo negativo debe ser > 1,0 y ≤ 2,5.<br>2. La viabilidad media de las réplicas tisulares expuestas durante 4 horas con el testigo positivo, expresada en % del testigo negativo, debe ser ≤ 20 %.<br>3. La diferencia de viabilidad entre dos réplicas tisulares debe ser inferior al 20 %. |

▼**M8**

*Apéndice 3*

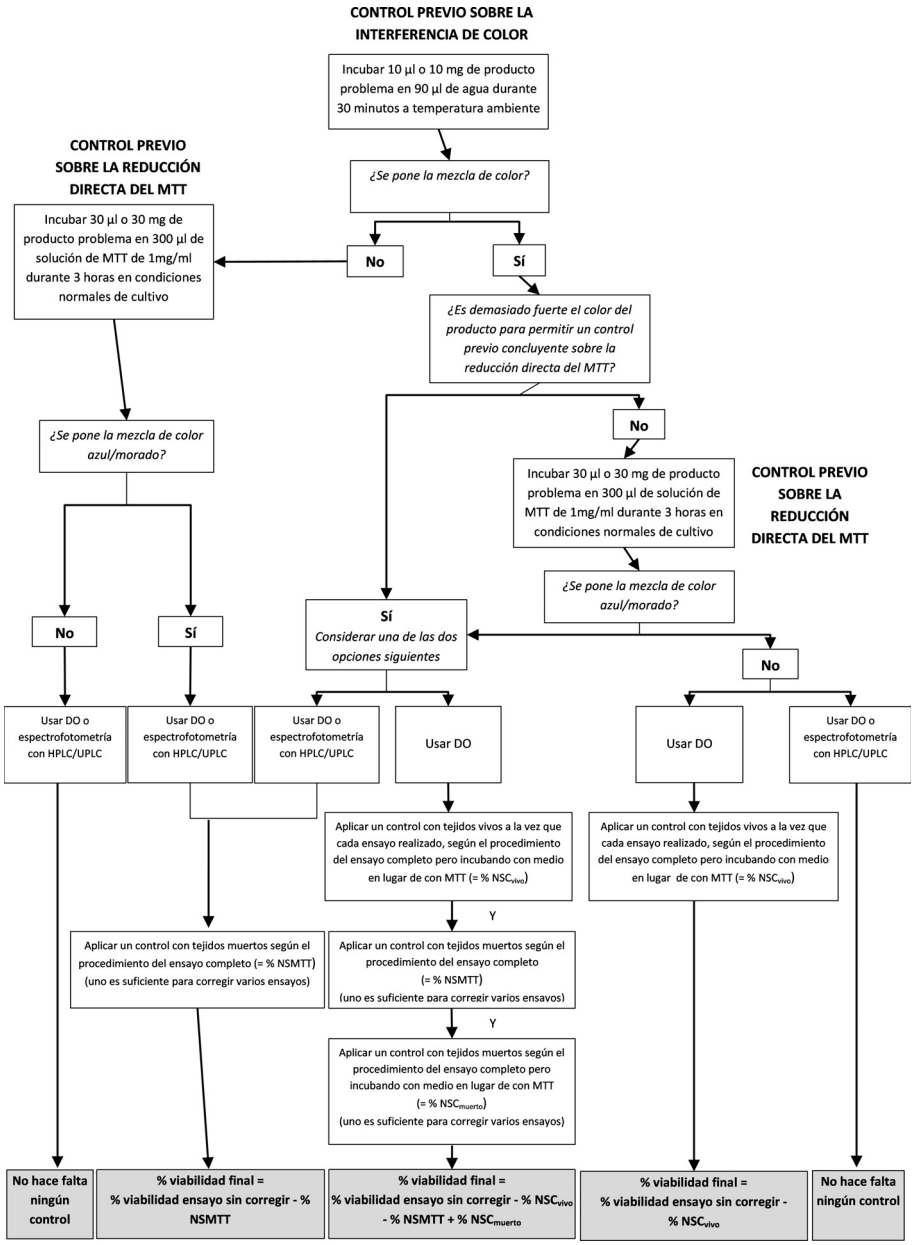
DIAGRAMA DE FLUJO ILUSTRATIVO CON ORIENTACIONES SOBRE CÓMO IDENTIFICAR Y TRATAR LOS REDUCTORES DIRECTOS DEL MTT Y/O LOS PRODUCTOS QUE INTERFIEREN CON EL COLOR, SOBRE LA BASE DE LOS PNT DEL MRV1



▼**M8**

*Apéndice 4*

DIAGRAMA DE FLUJO ILUSTRATIVO CON ORIENTACIONES SOBRE CÓMO IDENTIFICAR Y TRATAR LOS REDUCTORES DIRECTOS DEL MTT Y/O LOS PRODUCTOS QUE INTERFIEREN CON EL COLOR, SOBRE LA BASE DE LOS PNT DEL MRV2



▼**M8**

*Apéndice 5*

PARÁMETROS CLAVE Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN PARA CONSIDERAR APTO UN SISTEMA DE ESPECTROFOTOMETRÍA CON HPLC/UPLC PARA LA MEDICIÓN DEL FORMAZANO DE MTT EXTRAÍDO DE CONSTRUCCIONES TISULARES DE EHRSC

| Parámetro | Protocolo obtenido de las orientaciones de la FDA (36) (38) | Criterios de aceptación |
|---|---|---|
| Selectividad | Análisis de isopropanol, blanco vivo (extracto isopropanólico de construcciones tisulares de EHRSC vivo sin ningún tratamiento), blanco muerto (extracto isopropanólico de construcciones tisulares de EHRSC muerto sin ningún tratamiento) | $Área_{interferencia} \leq 20$ % del $Área_{LIC}$ ([1]) |
| Precisión | Controles de calidad (es decir, formazano de MTT a 1,6 µg/ml, 16 µg/ml y 160 µg/ml) en isopropanol (n = 5) | CV ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC |
| Exactitud | Controles de calidad en isopropanol (n = 5) | % Desv ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC |
| Efecto de matriz | Controles de calidad con blanco vivo (n = 5) | 85 % ≤ % efecto de matriz % ≤ 115 % |
| Efecto residual | Análisis de isopropanol después de un patrón para el LSC ([2]) | $Área_{interferencia} \leq 20$ % del $Área_{LIC}$ |
| Reproducibilidad (intradiaria) | Tres curvas de calibración independientes (sobre la base de 6 diluciones consecutivas a 1/3 de formazano de MTT en isopropanol, comenzando en el LSC, es decir, 200 µg/ml);<br>Controles de calidad en isopropanol (n = 5) | Curvas de calibración: % Desv ≤ 15 % o ≤ 20 % respecto al LIC<br>Controles de calidad: % Desv ≤ 15 % y CV ≤ 15 % |
| Reproducibilidad (interdiaria) | Día 1: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)<br>Día 2: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3)<br>Día 3: Una curva de calibración y controles de calidad en isopropanol (n = 3) | |
| Estabilidad a corto plazo del formazano de MTT en el extracto tisular de EHRSC | Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de 24 horas de conservación a temperatura ambiente | % Desv ≤ 15 % |
| Estabilidad a largo plazo del formazano de MTT en el extracto tisular de EHRSC, en caso necesario | Controles de calidad en el blanco vivo (n = 3) analizado el día de la preparación y después de varios días de conservación a -20 °C | % Desv ≤ 15 % |

([1]) LIC: Límite inferior de cuantificación, definido de forma que cubra una viabilidad tisular del 1-2 %, es decir, 0,8 µg/ml.

([2]) LSC: Límite superior de cuantificación, definido para ser, como mínimo, dos veces superior a la concentración más alta prevista de formazano de MTT en los extractos isopropanólicos de los testigos negativos (~70 µg/ml en el MRV), es decir, 200 µg/ml.

▼M8

B.70. **ENSAYOS *IN VITRO* CON RECEPTOR ESTROGÉNICO RECOMBINANTE HUMANO (hrER) PARA DETECTAR PRODUCTOS CON AFINIDAD PARA UNIRSE A LOS RECEPTORES ESTROGÉNICOS**

INTRODUCCIÓN GENERAL

**Directrices de ensayo de la OCDE sobre la base del comportamiento**

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 493 de la OCDE (2015). Las TG 493 son unas directrices de ensayo basadas en el comportamiento (*performance-based test guideline*, PBTG), en las que se describe la metodología de los ensayos *in vitro* con receptores recombinantes humanos para detectar sustancias con afinidad para unirse a los receptores estrogénicos (ensayos de unión al hrER). Comprenden dos ensayos similares desde el punto de vista mecánico y funcional para la identificación de los ligandos de los receptores estrogénicos (es decir, ERα) y deben facilitar la elaboración de nuevos métodos de ensayo similares o modificados, de conformidad con los principios de validación expuestos en el documento de orientación de la OCDE sobre la validación y la aceptación internacional de métodos de ensayo nuevos o actualizados para la evaluación de peligros (*Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*) (1). Los métodos de ensayo de referencia plenamente validados (apéndice 2 y apéndice 3) que sirven de base a dichas PBTG son estos:

— el ensayo de Freyberg-Wilson (FW) de unión a receptores estrogénicos *in vitro* utilizando un ERα recombinante humano completo (2), y

— el ensayo *in vitro* del Instituto de Evaluación e Investigación de Productos Químicos (Chemical Evaluation and Research Institute, CERI) de unión al receptor estrogénico con utilización de una proteína con un dominio de unión al ligando recombinante humano (2).

Se dispone de normas de comportamiento (NC) (3) para facilitar el desarrollo y la validación de métodos de ensayo similares para el mismo parámetro de peligro, considerando la modificación a su debido tiempo de las PBTG 493, de manera que puedan añadirse nuevos ensayos similares a unas PBTG actualizadas. Sin embargo, la adición de ensayos similares solo se efectuará previa revisión y acuerdo por parte de la OCDE en el sentido de que se cumplen las normas de comportamiento. Los ensayos incluidos en las TG 493 pueden utilizarse indistintamente para satisfacer los requisitos de los países miembros de la OCDE en cuanto a los resultados de los ensayos sobre la unión a los receptores estrogénicos, y también se benefician de la aceptación mutua de datos de la OCDE.

**Antecedentes y principios de los ensayos incluidos en este método de ensayo**

2. La OCDE lanzó en 1998 una actividad muy prioritaria para revisar las directrices existentes y elaborar nuevas directrices sobre los ensayos, tanto de cribado como finales, de posibles alteradores endocrinos. El marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de posibles alteradores endocrinos se revisó en 2012. Los marcos conceptuales originales y revisados se incluyen como anexos en el documento de orientación sobre las directrices de ensayo normalizadas para la evaluación de los productos en cuanto a las alteraciones endocrinas (4). El marco conceptual se compone de cinco niveles, cada uno de los cuales corresponde a un nivel diferente de complejidad biológica. Los ensayos de unión a receptores estrogénicos descritos en este método de ensayo son de nivel 2, que incluye los ensayos *in vitro* que aportan datos sobre los mecanismos y rutas endocrinos seleccionados. Este método se refiere a los ensayos *in vitro* de unión a receptores diseñados para identificar los ligandos del receptor estrogénico humano alfa (ERα).

▼**M8**

3. Se ha demostrado claramente la pertinencia del ensayo *in vitro* de unión a ER respecto a funciones biológicas. Los ensayos de unión a ER están diseñados para identificar productos que pueden alterar la ruta de las hormonas estrogénicas, y han sido utilizadas ampliamente durante las dos últimas décadas para caracterizar la distribución tisular de los ER, así como para identificar agonistas/antagonistas de los ER. Estos ensayos reflejan la interacción ligando-receptor, que es la fase inicial de la vía estrogénica de señalización y es esencial para la función reproductora en todos los vertebrados.

4. La interacción de los estrógenos con los ER puede afectar a la transcripción de genes controlados por estrógenos e inducir efectos no genómicos, lo cual puede dar lugar a la inducción o a la inhibición de procesos celulares, incluidos los necesarios para la proliferación celular, el desarrollo fetal normal y la función reproductora (5) (6) (7). La perturbación de los sistemas estrogénicos normales puede provocar efectos adversos sobre el desarrollo normal (ontogénesis), la salud reproductiva y la integridad del aparato reproductor. Una señalización inadecuada de los ER puede producir efectos tales como un mayor riesgo de cáncer dependiente de hormonas, trastornos de la fertilidad y alteraciones del crecimiento y el desarrollo del feto (8).

5. Los ensayos de unión de ligandos *in vitro* se basan en la interacción directa de una sustancia con el punto de unión de un ligando a un receptor específico que regula la transcripción de un gen. El componente clave del ensayo de unión al receptor estrogénico recombinante humano alfa (hrERα) mide la capacidad de un ligando radiomarcado ([$^3$H]17β-estradiol) para unirse al receptor estrogénico en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema (es decir, un competidor). Los productos problema que presentan una elevada afinidad por el receptor estrogénico compiten con el ligando radiomarcado a una concentración menor en comparación con los productos que presentan menor afinidad por el receptor. Este ensayo consta de dos componentes principales: un experimento de unión de saturación para caracterizar los parámetros de la interacción receptor-ligando y documentar la especificidad del ER, seguido de un experimento de unión de competencia que caracteriza la competencia entre un producto problema y un ligando radiomarcado para unirse al ER.

6. Los estudios de validación de los ensayos de unión del CERI y de FW han demostrado su pertinencia y fiabilidad con respecto a su finalidad prevista (2).

7. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en el presente método de ensayo se recogen en el apéndice 1.

**Ámbito de aplicación y limitaciones relativas a los ensayos de unión a receptores**

8. Estos ensayos se proponen para fines de cribado y establecimiento de prioridades, pero también pueden proporcionar información sobre un acontecimiento de iniciación molecular que pueda utilizarse en un enfoque de ponderación de las pruebas. Abordan la unión del producto al dominio de unión del ERα con el ligando en un sistema *in vitro*. Así pues, los resultados no deben extrapolarse directamente a la compleja señalización y regulación del sistema endocrino intacto *in vivo*.

▼**M8**

9. La unión del ligando natural, el 17β-estradiol, es la etapa inicial de una serie de acontecimientos moleculares que activa la transcripción de los genes diana y, en última instancia, culmina con un cambio fisiológico (9). Por lo tanto, la unión al dominio de unión del ERα con el ligando se considera uno de los mecanismos clave de la alteración endocrina (AE) con mediación de ER, aunque existen otros mecanismos a través de los cuales puede producirse la AE, entre los que se incluyen los siguientes: i) interacciones con puntos del ERα distintos de la cavidad de unión con el ligando, ii) interacciones con otros receptores pertinentes para la señalización estrogénica, ERβ y receptores estrogénicos acoplados con la proteína G, otros receptores y sistemas enzimáticos dentro del sistema endocrino, iii) síntesis de hormonas, iv) activación y/o inactivación metabólica de hormonas, v) distribución de hormonas a los tejidos diana, y vi) eliminación de hormonas del organismo. Ninguno de los ensayos con arreglo al presente método de ensayo aborda estos modos de acción.

10. Este método de ensayo aborda la capacidad de las sustancias de unirse al ERα humano y no distingue entre agonistas o antagonistas del ERα. Estos ensayos tampoco abordan otros acontecimientos posteriores, como la transcripción de genes o los cambios fisiológicos. Teniendo en cuenta que durante la validación únicamente se utilizaron sustancias de un solo componente, no se ha abordado la aplicabilidad a mezclas problema. Sin embargo, los ensayos son técnicamente aplicables a las sustancias de componentes múltiples y mezclas. Antes de la utilización del método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tales fines y, en caso afirmativo, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

11. Los sistemas de receptores sin células no tienen capacidad metabólica intrínseca y no han sido validados en combinación con sistemas enzimáticos metabólicos. Sin embargo, se podría incorporar la actividad metabólica en el diseño de un estudio, pero ello requeriría más esfuerzos de validación.

12. Los productos que pueden desnaturalizar la proteína (es decir, la proteína del receptor), como los tensioactivos o los productos que pueden cambiar el pH de la solución amortiguadora del ensayo, no pueden someterse a ensayo o solo a concentraciones que no presenten tales interacciones. Por lo demás, el intervalo de concentraciones que pueden utilizarse en los ensayos respecto a un producto problema está limitado por su solubilidad en la solución amortiguadora del ensayo.

13. A efectos de información, en el cuadro 1 se presentan los resultados de los ensayos correspondientes a las 24 sustancias que se estudiaron con los dos ensayos plenamente validados descritos en el presente método de ensayo. De estas sustancias, 17 se clasifican como ligandos del ER y 8 como no ligandos, sobre la base de los informes publicados, incluidos los ensayos *in vitro* de activación transcripcional de ER y/o el ensayo uterotrófico (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15). En referencia a los datos resumidos en el cuadro 1, había casi un 100 % de concordancia entre los dos ensayos en la clasificación de todas las sustancias hasta $10^{-4}$ M, y cada sustancia se clasificó correctamente como ligando / no ligando del ER. En las normas de comportamiento aplicables a los ensayos de unión al hrER se ofrece información suplementaria sobre este grupo de sustancias, así como sobre otras sustancias objeto de ensayos de unión al hrER durante los estudios de validación (3), apéndice 2 (cuadros 1, 2 y 3).

▼M8

*Cuadro 1*

**Clasificación de sustancias como ligandos o no ligandos del ER cuando se someten a los ensayos de unión al hrER de FW y del CERI con referencia a la respuesta prevista**

| | Nombre de la sustancia | N.º CAS | Respuesta prevista | Ensayo de FW | | Ensayo del CERI | | Clase química del MeSH | Clase de producto |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Intervalo de concentración (M) | Clasificación | Intervalo de concentración (M) | Clasificación | | |
| 1 | 17β-Estradiol | 50-28-2 | *Ligando* | $1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$ | Ligando | $1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$ | Ligando | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 2 | Noretinodrel | 68-23-5 | *Ligando* | $3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$ | Ligando | $3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$ | Ligando | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 3 | Noretindrona | 68-22-4 | *Ligando* | $3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$ | Ligando | $3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-4}$ | Ligando | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 4 | Ftalato de di-n-butilo | 84-74-2 | *No ligando* (*) | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$ | No ligando (**) (+) | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$ | No ligando (**) (+) | Hidrocarburos (cíclicos), ésteres | Plastificantes, productos intermedios |
| 5 | DES | 56-53-1 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Hidrocarburos (cíclicos), fenoles | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 6 | 17α-Etinilestradiol | 57-63-6 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 7 | *meso*-Hexestrol | 84-16-2 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Hidrocarburos (cíclicos), fenoles | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 8 | Genisteína | 446-72-0 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Hidrocarburos (heterocíclicos), flavonoides | Productos naturales |

▼M8

| | Nombre de la sustancia | N.º CAS | Respuesta prevista | Ensayo de FW | | Ensayo del CERI | | Clase química del MeSH | Clase de producto |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Intervalo de concentración (M) | Clasificación | Intervalo de concentración (M) | Clasificación | | |
| 9 | Ecuol | 531-95-3 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Metabolitos fitoestrogénicos | Productos naturales |
| 10 | Butilparabeno (4-hidroxibenzoato de n-butilo) | 94-26-8 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Parabenos | Conservantes |
| 11 | Nonilfenol (mezcla) | 84852-15-3 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Alquilfenoles | Compuestos intermedios |
| 12 | *o,p'*-DDT | 789-02-6 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Organoclorados | Insecticidas |
| 13 | Corticosterona | 50-22-6 | *No ligando* (*) | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$ | No ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-4}$ | No ligando | Esteroides | Productos naturales |
| 14 | Zearalenona | 17924-92-4 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Hidrocarburos (heterocíclicos), lactonas | Productos naturales |
| 15 | Tamoxifeno | 10540-29-1 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 16 | 5α-Dihidrotestosterona | 521-18-6 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Esteroides, no fenólicos | Productos naturales |
| 17 | Bisfenol A | 80-05-7 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Fenoles | Productos intermedios |
| 18 | 4-n-Heptilfenol | 1987-50-4 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Dudoso ([a]) | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Alquilfenoles | Productos intermediarios |

▼M8

| | Nombre de la sustancia | N.º CAS | Respuesta prevista | Ensayo de FW | | Ensayo del CERI | | Clase química del MeSH | Clase de producto |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Intervalo de concentración (M) | Clasificación | Intervalo de concentración (M) | Clasificación | | |
| 19 | Kepona (clordecona) | 143-50-0 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Hidrocarburos (halogenados) | Plaguicidas |
| 20 | Benzo[a]antraceno | 56-55-3 | *No ligando* | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | No ligando ([b]) | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | No ligando ([b]) | Hidrocarburos aromáticos | Productos intermediarios |
| 21 | Enterolactona | 78473-71-9 | *Ligando* | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | Ligando | Fitoestrógenos | Productos naturales |
| 22 | Progesterona | 57-83-0 | *No ligando* (*) | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | No ligando | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | No ligando | Esteroides | Productos naturales |
| 23 | Octiltrietoxisilano | 2943-75-1 | *No ligando* | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | No ligando | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-3}$ | No ligando | Silanos | Modificadores de superficie |
| 24 | Atrazina | 1912-24-9 | *No ligando* (*) | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | No ligando | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | No ligando | Compuestos heterocíclicos | Herbicidas |

(*) Límite de solubilidad $< 1 \times 10^{-4}$ M.

(**) El uso y la clasificación del ftalato de di-n-butilo (DBP) como no ligando se basó en ensayos con concentraciones de hasta $10^{-4}$ M porque se observó que la sustancia era insoluble a concentraciones del orden de $10^{-3}$ M (por ejemplo, turbidez) en algunos laboratorios durante los estudios de prevalidación.

([+]) Durante el estudio de validación, el ftalato de di-n-butilo (DBP) se sometió a ensayo como sustancia problema codificada a concentraciones de hasta $10^{-3}$ M. En estas condiciones, algunos laboratorios observaron una disminución de los radioligandos que se unían a la concentración más elevada ($10^{-3}$ M) y/o un ajuste ambiguo de la curva. Con estas tandas, el DBP se clasificó como «dudoso» o «ligando» en 3/5 de los laboratorios que utilizaban el ensayo del CERI y en 5/6 de los laboratorios que utilizaban el ensayo de FW (véase la referencia (2), secciones IV.B.3.a,b y VI.A).

([a]) Clasificación que no coincidía con la clasificación prevista. La clasificación de 4-n-heptilfenol como «dudosa» o «no ligando» por 3/5 de los laboratorios dio lugar a una clasificación media como «dudosa». Una inspección más de cerca reveló que esto se debía a limitaciones de la solubilidad del producto que impidieron la producción de una curva completa de unión.

([b]) Durante el estudio de validación, el benzo[a]antraceno se reclasificó como no ligando (es decir, negativo) sobre la base de la bibliografía publicada que demostraba que la actividad estrogénica *in vitro* declarada para esta sustancia (16) depende principalmente de su activación metabólica (17) (18). La activación metabólica enzimática de la sustancia no estaría prevista en los ensayos de unión al hrER sin células, tal como se utilizan en este estudio de validación interlaboratorios. Por lo tanto, la clasificación correcta de esta sustancia es como «no ligando» cuando se utiliza en las condiciones experimentales de los ensayos de FW y del CERI.

▼M8

COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER

**Componentes esenciales del ensayo**

14. Este método de ensayo se aplica a los ensayos con un receptor ER y un ligando con la fuerza adecuada para unirse al receptor que puede utilizarse como marcador para el ensayo y puede ser desplazado con concentraciones cada vez mayores de un producto problema. Los ensayos de unión contienen los dos componentes principales siguientes: 1) unión de saturación y 2) unión de competencia. El ensayo de unión de saturación se utiliza para confirmar la especificidad y la actividad de los preparados de receptores, mientras que el experimento de unión de competencia se utiliza para evaluar la capacidad de un producto problema para unirse al hrER.

**Testigos**

15. Debe describirse la base del estrógeno de referencia y de los testigos en paralelo propuestos. Los testigos en paralelo [de disolvente (vehículo), positivos (ligando del ER; con afinidad fuerte y débil), negativos (no ligando)], según proceda, sirven para indicar que el ensayo funciona en las condiciones de ensayo y proporcionan la base para comparar unos experimentos con otros; generalmente forman parte de los criterios de aceptabilidad de un experimento dado (1). Deben incluirse en una placa de cada tanda todos los puntos que forman las curvas de concentración completas del estrógeno de referencia y de los testigos (es decir, ligando débil y no ligando). Todas las demás placas deben contener: 1) una concentración alta (con desplazamiento aproximadamente total del ligando radiomarcado) y media (aproximadamente la $CI_{50}$) de E2 y ligando débil, cada uno por triplicado; 2) el testigo de disolvente y el ligando inespecífico, cada uno por triplicado.

**Procedimientos normales de control de calidad**

16. Deben llevarse a cabo procedimientos normales de control de calidad, tal como se describe para cada ensayo, a fin de garantizar que los receptores activos, las concentraciones correctas de los productos y los límites de tolerancia se mantienen estables a lo largo de varios pases, y conservan a lo largo del tiempo la capacidad de proporcionar las respuestas esperadas de unión a los ER.

**Demostración de la competencia del laboratorio**

17. Antes de someter productos desconocidos a alguno de los ensayos con arreglo al presente método, cada laboratorio debe demostrar su competencia para utilizar el ensayo realizando ensayos de saturación para confirmar la especificidad y la actividad de la preparación del ER, y ensayos de unión de competencia del estrógeno de referencia y de los testigos (es decir, ligando débil y no ligando). El laboratorio debe establecer una base de datos históricos con los resultados del estrógeno de referencia y de los testigos generados mediante 3-5 experimentos independientes llevados a cabo en diferentes días. Estos experimentos servirán de base para el estrógeno de referencia y los testigos históricos del laboratorio, y se utilizarán como evaluación parcial de la aceptabilidad del ensayo para futuras tandas.

18. La sensibilidad del sistema de ensayo también será confirmada mediante el ensayo de las sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el cuadro 2. La lista de sustancias para la prueba de la competencia es un subconjunto de las sustancias de referencia que figuran en las normas de comportamiento relativas a los ensayos de unión a los ER (3). Estas sustancias están disponibles en el mercado, representan las clases de productos normalmente asociadas con la actividad de unión a los ER, y presentan una gama adecuada de potencia esperada como ligandos (es decir, de fuerte a débil) y no ligandos (es decir, negativos). Respecto a cada sustancia para la prueba de la competencia, las concentraciones ensayadas deben cubrir el intervalo indicado en el cuadro 2. Deben realizarse al menos tres experimentos con cada sustancia y los resultados deben ser conformes a la actividad química esperada. Cada experimento debe realizarse de forma independiente (es decir, con diluciones nuevas del receptor, de los productos y del reactivo), con tres réplicas por cada concentración. La competencia se demuestra por la clasificación correcta (positiva/negativa) de cada sustancia para la prueba de la competencia. Cada técnico debe realizar la prueba de la competencia al aprender los ensayos.

▼M8

*Cuadro 2*

**Lista de testigos y sustancias para la prueba de la competencia en relación con los ensayos de unión de competencia al hrER** [1]

| N.º | Nombre de la sustancia | N.º CAS [2] | Respuesta esperada [3] [4] | Intervalo conc. ensayo (M) | Clase química según el sistema MeSH [5] | Clase de producto [6] |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Testigos (estrógeno de referencia, ligando débil, no ligando)** | | | | | | |
| 1 | 17β-Estradiol | 50-28-2 | Ligando | $1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$ | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 2 | Noretinodrel (o) noretindrona | 68-23-5 (o) 68-22-4 | Ligando | $3 \times 10^{-9} – 30 \times 10^{-6}$ | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 3 | Octiltrietoxisilano | 2943-75-1 | No ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Silanos | Modificadores de superficie |
| **Sustancias para la prueba de la competencia** [6] | | | | | | |
| 4 | Dietilestilbestrol | 56-53-1 | Ligando | $1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$ | Hidrocarburos (cíclicos), fenoles | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 5 | 17α-Etinilestradiol | 57-63-6 | Ligando | $1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$ | Esteroides | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 6 | *meso*-Hexestrol | 84-16-2 | Ligando | $1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$ | Hidrocarburos (cíclicos), fenoles | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 7 | Tamoxifeno | 10540-29-1 | Ligando | $1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-6}$ | Hidrocarburos (cíclicos) | Productos farmacéuticos, productos veterinarios |
| 8 | Genisteína | 446-72-0 | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Compuestos heterocíclicos, flavonoides | Productos naturales |
| 9 | Bisfenol A | 80-05-7 | Ligando | $1 \times 10^{-10} – 1 \times 10^{-3}$ | Fenoles | Productos intermedios |
| 10 | Zearalonona | 17924-92-4 | Ligando | $1 \times 10^{-11} – 1 \times 10^{-3}$ | Compuestos heterocíclicos, lactonas | Productos naturales |

▼M8

| N.º | Nombre de la sustancia | N.º CAS ([2]) | Respuesta esperada ([3]) ([4]) | Intervalo conc. ensayo (M) | Clase química según el sistema MeSH ([5]) | Clase de producto ([6]) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 11 | Butilparabenos | 94-26-8 | Ligando | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-3}$ | Ácidos carboxílicos, fenoles | Conservantes |
| 12 | Atrazina | 1912-24-9 | No ligando | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-6}$ | Compuestos heterocíclicos | Herbicidas |
| 13 | Ftalato de di-n-butilo (DBP) ([7]) | 84-74-2 | No ligando ([8]) | $1 \times 10^{-10} - 1 \times 10^{-4}$ | Hidrocarburos (cíclicos), ésteres | Plastificantes, productos intermedios |
| 14 | Corticosterona | 50-22-6 | No ligando | $1 \times 10^{-11} - 1 \times 10^{-4}$ | Esteroides | Productos naturales |

([1]) Si una sustancia para la prueba de la competencia deja de estar disponible en el comercio, puede utilizarse una sustancia con la misma clasificación en cuanto a la unión a los ER, con una potencia comparable y la misma clase química.

([2]) Abreviaturas: Nº CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

([3]) Clasificación como ligandos o no ligandos del ERα durante el estudio de validación de los ensayos de unión al hrER de FW y del CERI (2).

([4]) La actividad en cuanto a la unión a los ER se basó en los documentos de revisión de fondo del ICCVAM (BRD) sobre los ensayos de unión a los ER y TA (9), así como en datos empíricos y otra información obtenida de estudios de referencia publicados y revisados (10) (11) (12) (13) (14) (15).

([5]) Las sustancias se asignaron a una o varias clases químicas con arreglo al U.S. National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH), que es un sistema de clasificación normalizado internacionalmente reconocido (diponible en: http://www.nlm.nih.gov/mesh).

([6]) Las sustancias se asignaron a una o varias clases de producto con arreglo al banco de datos U.S. National Library of Medicine's Hazardous Substances Data Bank (disponible en: http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/)

([7]) El DBP puede utilizarse como no ligando testigo alternativo ensayado a una concentración máxima de $10^{-4}$ M.

([8]) El límite de solubilidad de esta sustancia es $10^{-4}$ M. El uso y la clasificación del ftalato de di-n-butilo (DBP) como no ligando se basó en ensayos a concentraciones de hasta $10^{-4}$ M porque se observó que la sustancia era insoluble a la concentración de $10^{-3}$ M (por ejemplo, turbidez) en algunos laboratorios durante los estudios de prevalidación.

▼M8

**Ensayo de solubilidad y determinación del intervalo de concentraciones de los productos problema**

19. Debe realizarse un ensayo preliminar para determinar el límite de solubilidad de cada producto problema y para identificar el intervalo adecuado de concentraciones que se ha de utilizar al realizar el ensayo. El límite de solubilidad de cada producto problema se determina inicialmente en el disolvente y se confirma después en las condiciones del ensayo. La concentración final utilizada en el ensayo no deberá ser superior a 1 mM. La determinación del intervalo de concentraciones consiste en someter a ensayo un control del disolvente, junto con ocho diluciones logarítmicas en serie, a partir de la concentración máxima aceptable (por ejemplo, 1 mM o menos, sobre la base del límite de solubilidad), y anotar la presencia de turbidez o precipitado. Las concentraciones en los experimentos segundo y tercero deben ajustarse según convenga para caracterizar mejor la curva concentración-respuesta.

**Criterios de aceptabilidad de las tandas de ensayo**

20. La aceptación o el rechazo de una tanda de ensayo se basa en la evaluación de los resultados obtenidos con el estrógeno de referencia y el testigo utilizados para cada experimento. En primer lugar, para la placa 1, las curvas completas de concentración de los testigos de referencia de cada experimento deben cumplir los criterios de comportamiento con parámetros de ajuste de las curvas (por ejemplo, $CI_{50}$ y pendiente de Hill), sobre la base de los resultados comunicados en relación con los respectivos protocolos de los ensayos del CERI y de FW (apéndices 2 y 3), y de los datos de controles históricos del laboratorio que realice el ensayo. Todos los testigos (estrógeno de referencia, ligando débil y no ligando) deben clasificarse correctamente en cada experimento. En segundo lugar, los testigos de todas las placas posteriores deben evaluarse en cuanto a su coherencia con la placa 1. Debe utilizarse un intervalo suficiente de concentraciones del producto problema para definir claramente la parte superior de la curva de unión de competencia. La variabilidad entre las réplicas de cada concentración del producto problema, así como entre las tres tandas independientes, debe ser razonable y científicamente justificable. La capacidad de realizar el ensayo de forma coherente debe demostrarse mediante la elaboración y el mantenimiento de una base de datos históricos sobre el estrógeno de referencia y los testigos. Las desviaciones típicas (DT) o los coeficientes de variación (CV) de las medias de los parámetros de ajuste de las curvas del estrógeno de referencia y de los ligandos débiles testigo a partir de experimentos múltiples pueden utilizarse como medida de la reproducibilidad intralaboratorios. A la hora de revisar los resultados de los testigos de las placas de cada tanda, así como respecto a cada producto problema, debe aplicarse un juicio profesional.

Además, deben seguirse los siguientes principios en relación con los criterios de aceptabilidad:

— Los datos deben ser suficientes para una evaluación cuantitativa de la unión a los ER;

— Las concentraciones ensayadas deben mantenerse dentro del intervalo de solubilidad del producto problema.

**Análisis de los datos**

21. El procedimiento definido de análisis de los datos relativos a la unión de saturación y de competencia deben respetar los principios clave para caracterizar las interacciones receptor-ligando. Normalmente, los datos relativos a la unión de saturación se analizan utilizando un modelo de regresión no lineal que tiene en cuenta la unión total y la inespecífica. Al determinar los parámetros Bmax y Kd, puede ser necesario efectuar una corrección para tener en cuenta el agotamiento de los ligandos [p. ej., Swillens, 1995 (19)]. Los datos procedentes de la unión de competencia suelen transformarse [por ejemplo, porcentaje de unión específica y concentración del

▼M8

producto problema (log M)]. Deben estimarse los valores de log $CI_{50}$ de cada producto problema, utilizando un programa informático adecuado de ajuste de curvas no lineales para ajustarse a una ecuación de Hill de cuatro parámetros. Tras el análisis inicial, debe llevarse a cabo una revisión visual y con los parámetros de ajuste de la curva sobre el grado de calidad del ajuste de los datos de la unión con la curva de unión de competencia generada. En algunos casos, puede ser necesario realizar un análisis adicional para obtener el mejor ajuste de la curva (por ejemplo, limitar la parte superior y/o inferior de la curva, utilizar la regla del 10 %); véase el apéndice 4 y la referencia 2 (sección III.A.2).

22. El cumplimiento de los criterios de aceptabilidad (punto 20) indica que el sistema de ensayo funciona correctamente, pero no garantiza que cualquier ensayo concreto produzca datos exactos. La reproducción de los resultados correctos del primer ensayo es la mejor indicación de que se han producido datos exactos.

**Criterios generales de interpretación de los datos**

23. Actualmente no se dispone de un método aceptado universalmente para interpretar los datos de la unión al ER. Sin embargo, tanto las evaluaciones cualitativas (por ejemplo, ligando / no ligando) como las cuantitativas [por ejemplo, log $CI_{50}$, afinidad relativa de unión (*Relative Binding Affinity*, RBA)] de la actividad mediada por el hrER deben basarse en datos empíricos y en un sólido juicio científico.

**Informe del ensayo**

24. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Ensayo:*

— ensayo utilizado;

*Testigo/ producto de referencia /producto problema*

— origen, número de lote, fecha límite de utilización, si se dispone de ellos;

— estabilidad del producto problema en sí, si se conoce;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente, si se conocen;

— medición del pH, osmolalidad y precipitado en el medio de cultivo al que se ha añadido el producto problema, según proceda.

Sustancias de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores; pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase más arriba), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

▼**M8**

*Disolvente o vehículo:*

— caracterización (naturaleza, proveedor y lote);

— justificación de la elección del disolvente o vehículo;

— solubilidad y estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo, si se conocen.

*Receptores:*

— fuente de receptores (proveedor, número de catálogo, lote, especie del receptor, concentración del receptor activo facilitada por el proveedor, certificación del proveedor);

— caracterización de los receptores (incluidos los resultados de la unión de saturación): Kd, Bmax;

— conservación de los receptores;

— ligandos radiomarcados:

— proveedor, número de catálogo, lote, actividad específica.

*Condiciones del ensayo:*

— limitaciones de la solubilidad en las condiciones del ensayo;

— composición de la solución amortiguadora del ligando;

— concentración del receptor;

— concentración del marcador (por ejemplo, ligando radiomarcado);

— concentraciones del producto problema;

— porcentaje del vehículo en el ensayo final;

— temperatura y duración de la incubación;

— método de separación entre sustancia unida y libre;

— testigos positivos y negativos / sustancias de referencia;

— criterios empleados para considerar que los resultados de los ensayos son positivos, negativos o dudosos.

*Comprobación de la aceptabilidad:*

— valores reales de $CI_{50}$ y pendiente de Hill, correspondientes a los testigos positivos en paralelo y a las sustancias de referencia.

*Resultados:*

— datos brutos y datos sobre la sustancia unida y libre;

— comprobación de confirmación de la desnaturalización, si procede;

— si existe, concentración efectiva mínima ($CE_{Min}$);

— valores de RBA y/o de $CI_{50}$, según proceda;

— relación concentración-respuesta, cuando sea posible;

— análisis estadísticos, en su caso, junto con una medida del error y de la confianza (por ejemplo, SEM, DT, CV o IC del 95 %) y una descripción de cómo se han obtenido dichos valores.

▼**M8**

*Discusión de los resultados:*

— aplicación de la regla del 10 %.

*Conclusión*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2005). Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 34), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(2) OCDE (2015): Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organisation for Economic Cooperation and Development, París.

(3) OCDE (2015): Performance Standards for Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα), Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 222), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(4) OCDE (2012). Guidance Document on Standardized Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Environmental, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(5) Cavailles V. (2002). Estrogens and Receptors: an Evolving Concept, Climacteric, 5 Suppl 2: p. 20-6.

(6) Welboren W.J., *et al.* (2009). Genomic Actions of Estrogen Receptor Alpha: What are the Targets and How are they Regulated? *Endocr*. Relat. Cancer., 16(4): p. 1073-89.

(7) Younes M. and Honma N. (2011). Estrogen Receptor Beta, Arch. *Pathol*. Lab. Med., 135(1): p. 63-6.

(8) Diamanti-Kandarakis *et al.* (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: an Endocrine Society Sci. Statement, Endo Rev 30(4):293-342.

(9) ICCVAM (2002). Background Review Document. Current Status of Test Methods for Detecting Endocrine Disruptors: *In Vitro* Estrogen Receptor Binding Assays. (NIH Publication No 03-4504). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.

(10) ICCVAM (2003). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(11) ICCVAM (2006). ICCVAM Evaluation of *In Vitro* Test Methods for Detecting Potential Endocrine Disruptors: Estrogen Receptor and Androgen Receptor Binding and Transcriptional Activation Assays.

(12) Akahori Y. *et al.* (2008). Relationship Between the Results of *In Vitro* Receptor Binding Assay to Human Estrogen Receptor Alpha and *In Vivo* Uterotrophic Assay: Comparative Study with 65 Selected Chemicals, *Toxicol. In Vitro*, 22(1): 225-231.

(13) OCDE (2007). Additional Data Supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in Rodents, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 67), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

▼**M8**

(14) Takeyoshi, M. (2006). Draft Report of Pre-validation and Inter-laboratory Validation For Stably Transfected Transcriptional Activation (TA) Assay to Detect Estrogenic Activity - The Human Estrogen Receptor Alpha Mediated Reporter Gene Assay Using hER-HeLa-9903 Cell Line, Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI): Japan. p. 1-188.

(15) Yamasaki, K; Noda, S; Imatanaka, N; Yakabe, Y. (2004). Comparative Study of the Uterotrophic Potency of 14 Chemicals in a Uterotrophic Assay and their Receptor-Binding Affinity, Toxicol. Letters, 146: 111-120.

(16) Kummer V; Maskova, J; Zraly, Z; Neca, J; Simeckova, P; Vondracek, J; Machala, M. (2008). Estrogenic Activity of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Uterus of Immature Wistar Rats. *Toxicol.* Letters, 180: 213-221.

(17) Gozgit, JM; Nestor, KM; Fasco, MJ; Pentecost, BT; Arcaro, KF. (2004). Differential Action of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Endogenous Estrogen-Responsive Genes and on a Transfected Estrogen-Responsive Reporter in MCF-7 Cells. *Toxicol. and Applied Pharmacol*., 196: 58-67.

(18) Santodonato, J. (1997). Review of the Estrogenic and Antiestrogenic Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Relationship to Carcinogenicity. Chemosphere, 34: 835-848.

(19) Swillens S (1995). Interpretation of Binding Curves Obtained with High Receptor Concentrations: Practical Aid for Computer Analysis, Mol Pharmacol 47(6):1197-1203.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS

**Regla del 10 %:** Opción de excluir de los análisis los puntos de datos en los que la media de las réplicas tiene un valor porcentual de unión especifica al [$^3$H]17β-estradiol que es igual o superior al 10 % del valor medio a una concentración inferior (véase el apéndice 4).

**Criterios de aceptabilidad:** Normas mínimas para la realización de controles experimentales y patrones de referencia. Para que un experimento se considere válido deben cumplirse todos los criterios de aceptabilidad.

**Exactitud (concordancia):** Grado de coincidencia entre los resultados de un ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de «concordancia» se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un ensayo (1).

**MC:** Marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos.

**Producto:** Sustancia o mezcla.

**CV:** Coeficiente de variación.

**E2:** 17β-Estradiol

**AE:** Alteración endocrina.

**hERα:** Receptor estrogénico humano alfa.

**ER:** Receptor estrogénico.

**Actividad estrogénica:** Capacidad de un producto para imitar al 17β-estradiol en su posibilidad de unirse a los receptores estrogénicos y activarlos. La unión al hERα puede detectarse con este método de ensayo.

**$CI_{50}$:** Concentración del producto problema que produce la mitad de la inhibición máxima.

**ICCVAM:** Comité de Coordinación Interagencias sobre la Validación de Métodos Alternativos de Estados Unidos (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods).

**Reproducibilidad interlaboratorios:** Medida del grado en que distintos laboratorios cualificados, utilizando el mismo protocolo y sometiendo a ensayo las mismas sustancias, pueden producir resultados cualitativa y cuantitativamente similares. La reproducibilidad interlaboratorios se determina durante los procesos de prevalidación y validación, e indica el grado en que un ensayo puede transferirse con éxito entre laboratorios; se denomina también reproducibilidad entre laboratorios (1).

**Reproducibilidad intralaboratorios:** Determinación del grado en que personas cualificadas del mismo laboratorio pueden repetir con éxito los resultados en momentos diferentes, utilizando un protocolo especificado. También se denomina reproducibilidad dentro del laboratorio (1).

**$CE:_{Mín}$:** Concentración efectiva mínima; es la concentración más baja del producto problema que produce una respuesta (es decir, la concentración más baja del producto problema en la que el factor de inducción es estadísticamente diferente al del control del vehículo en paralelo).

▼**M8**

**Ensayos de imitación:** Expresión coloquial para denominar los ensayos que son estructural y funcionalmente similares a un método de ensayo de referencia validado y aceptado. También se pueden denominar métodos de ensayo similares.

**PBTG:** Directrices de ensayo basadas en el comportamiento (*Performance-Based Test Guideline*).

**Normas de comportamiento:** Normas, basadas en un método de ensayo validado, que proporcionan la base para evaluar la comparabilidad de un ensayo propuesto que es similar desde el punto de vista mecánico y funcional. Se incluye lo siguiente: 1) los componentes esenciales del ensayo; 2) una lista mínima de productos de referencia seleccionados de entre los productos utilizados para demostrar el comportamiento aceptable del método de ensayo validado; y 3) los niveles similares de fiabilidad y exactitud, basados en lo obtenido con el método de ensayo validado, que el ensayo propuesto debe demostrar cuando se evalúa con la lista mínima de productos de referencia (1).

**Sustancias para la prueba de la competencia:** Subconjunto de las sustancias de referencia incluidas en las normas de comportamiento que pueden ser utilizadas por los laboratorios para demostrar la competencia técnica con un ensayo normalizado. Los criterios de selección de estas sustancias suelen incluir que representen la gama de respuestas, que estén disponibles en el mercado y que se disponga sobre ellas de datos de referencia de alta calidad.

**Competencia:** Capacidad demostrada de realizar correctamente un ensayo antes de someter a este sustancias desconocidas.

**Estrógeno de referencia:** 17ß-estradiol (E2, CAS 50-28-2).

**Métodos de ensayo de referencia:** Ensayos sobre los que se basan las PBTG 493.

**RBA:** Afinidad relativa de unión (*Relative Binding Affinity*). La RBA de una sustancia se calcula como porcentaje del log $CI_{50}$ de la sustancia respecto al log $CI_{50}$ del 17β-estradiol.

**Pertinencia:** Descripción de la relación de un ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un ensayo (1).

**Fiabilidad:** Medida del grado en que un ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios.

**DT:** Desviación típica.

**Producto problema:** Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Método de ensayo validado:** Ensayo sobre el cual se han completado estudios de validación para determinar su pertinencia (incluida su exactitud) y su fiabilidad con un fin específico. Es importante señalar que un método de ensayo validado podría no tener un comportamiento suficiente en términos de exactitud y fiabilidad como para considerarse aceptable a efectos del fin propuesto (1).

**Validación:** Proceso por el que se establece para un fin determinado la fiabilidad y pertinencia de un enfoque, método, ensayo, proceso o evaluación concretos (1).

▼**M8**

*Apéndice 2*

ENSAYOS DE FREYBERGER-WILSON DE UNIÓN DE SATURACIÓN Y DE COMPETENCIA A RECEPTORES ESTROGÉNICOS (ERA) IN VITRO UTILIZANDO EL ERα RECOMBINANTE HUMANO COMPLETO

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo de unión de saturación y de competencia a receptores estrogénicos (ERα) *in vitro* utiliza un receptor ERα humano completo (hrERα) que se produce en células de insectos infectadas con baculovirus, de las que después se aísla. El protocolo, elaborado por Freyberger y Wilson, fue sometido a un estudio de validación internacional multilaboratorios (2), que demostró su pertinencia y fiabilidad para la finalidad prevista del ensayo.

2. Este ensayo es un procedimiento de cribado para identificar sustancias que pueden unirse al hrERα completo. Se utiliza para determinar la capacidad de un producto problema de competir con el 17β-estradiol para unirse al hrERα. Los resultados cuantitativos del ensayo pueden incluir la $CI_{50}$ (medida de la concentración del producto problema necesaria para desplazar la mitad del [$^3$H]17β-estradiol del hrERα) y las afinidades relativas de unión de los productos problema respecto al hrERα en comparación con el 17β-estradiol. A efectos de cribado de los productos problema, entre los resultados cualitativos aceptables de los ensayos pueden incluirse la clasificación de los productos problema como ligandos o no ligandos del hrERα, o bien si el resultado es dudoso sobre la base de los criterios descritos para las curvas de unión.

3. El ensayo utiliza un ligando radiactivo, lo que impone al laboratorio la obligación de disponer de una licencia de materiales radiactivos. Todos los procedimientos con radioisótopos y productos peligrosos deben ajustarse a las normas y procedimientos descritos en la legislación nacional.

4. Las secciones «**INTRODUCCIÓN GENERAL** » y «**COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER** » deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en las presentes directrices de ensayo se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

5. El ensayo de unión al hrERα mide la capacidad de un ligando radiomarcado ([$^3$H]17β-estradiol) para unirse al receptor estrogénico en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema (es decir, un competidor). Los productos problema que presentan una elevada afinidad por el receptor estrogénico compiten con el ligando radiomarcado a una concentración menor en comparación con los productos que presentan menor afinidad por el receptor.

6. Este ensayo consta de dos componentes principales: un experimento de unión de saturación para caracterizar los parámetros de la interacción receptor-ligando, seguido de un experimento de unión de competencia que caracteriza la competencia entre un producto problema y un ligando radiomarcado para unirse al ER.

7. El objetivo del experimento de unión de saturación es caracterizar un determinado lote de receptores en cuanto a su afinidad de unión y número para preparar el experimento de unión de competencia. El experimento de unión de saturación mide, en condiciones de equilibrio, la afinidad de una concentración fija del receptor estrogénico por su ligando natural (representada por la constante de disociación, Kd) y la concentración de puntos activos de unión de los receptores (Bmax).

▼M8

8. El experimento de unión de competencia mide la afinidad de una sustancia para competir con el [$^3$H]17β-estradiol en cuanto a la unión al ER. La afinidad se cuantifica por la concentración del producto problema que, en equilibrio, inhibe el 50 % de la unión específica del [$^3$H]17β-estradiol (denominada "concentración inhibitoria del 50 %" o $CI_{50}$). También puede evaluarse utilizando la afinidad relativa de unión (RBA, en relación con la $CI_{50}$ del estradiol medida aparte en la misma tanda). El experimento de unión de competencia mide la unión del [$^3$H]17β-estradiol a una concentración fija en presencia de una amplia gama de concentraciones (ocho órdenes de magnitud) del producto problema. A continuación, se ajustan los datos, en la medida de lo posible, a una forma de la ecuación de Hill (Hill, 1910) que describe el desplazamiento del radioligando por un ligando competitivo de un solo punto de unión. La magnitud del desplazamiento del estradiol radiomarcado en equilibrio se utiliza para caracterizar el producto problema como ligando, no ligando, o generador de una respuesta dudosa.

PROCEDIMIENTO

**Demostración del comportamiento aceptable de la proteína del hrERα**

9. Con anterioridad a la realización sistemática de los ensayos de unión de saturación y de competencia, se debe demostrar que cada nuevo lote de hrERα presenta un comportamiento correcto en el laboratorio en el que se va a utilizar. Para demostrar el comportamiento debe seguirse un proceso de dos fases. Se trata de las siguientes:

— Realizar un ensayo de unión de [$^3$H]17β-estradiol de saturación para demostrar la especificidad y saturación del hrERα. El análisis de regresión no lineal de estos datos (por ejemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) y la consiguiente gráfica de Scatchard deben documentar la afinidad de unión al hrERα del [$^3$H]17β-estradiol (Kd) y el número de receptores (Bmax) respecto a cada lote del hrERα.

— Llevar a cabo un ensayo de unión de competencia utilizando las sustancias testigo [estrógeno de referencia (17β-estradiol)], un ligando débil (por ejemplo, noretinodrel o noretindrona), y un no ligando (octiltrietoxisilano, OTES). Cada laboratorio debe establecer una base de datos históricos para documentar la coherencia de la $CI_{50}$ y de otros valores pertinentes sobre el estrógeno de referencia y el ligando débil entre experimentos y diferentes lotes de hrERα. Los parámetros de las curvas de unión de competencia de las sustancias testigo deben estar dentro de los límites del intervalo de confianza del 95 % (véase el cuadro 1) que se han establecido utilizando datos de los laboratorios que participaron en el estudio de validación de este ensayo (2).

*Cuadro 1*

**Criterios de comportamiento establecidos para el estrógeno de referencia y el ligando débil, ensayo de FW de unión al hrER.**

| Sustancia | Parámetro | Media [a] | Desviación típica (n) | Intervalos de confianza del 95 % [b] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| **17β-Estradiol** | Parte superior (%) | 100,44 | 10,84 (67) | 97,8 | 103,1 |
| | Parte inferior (%) | 0,29 | 1,25 (67) | -0,01 | 0,60 |
| | Pendiente de Hill | -1,06 | 0,20 (67) | -1,11 | -1,02 |
| | Log $CI_{50}$ (M) | -8,92 () | 0,18 (67) | -8,97 | -8,88 |

▼M8

| Sustancia | Parámetro | Media (a) | Desviación típica (n) | Intervalos de confianza del 95 % (b) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| **Noretinodrel** | Parte superior (%) | 99,42 | 8,90 (68) | 97,27 | 101,60 |
| | Parte inferior (%) | 2,02 | 3,42 (68) | 1,19 | 2,84 |
| | Pendiente de Hill | -1,01 | 0,38 (68) | -1,10 | -0,92 |
| | Log $CI_{50}$ (M) | -6,39 | 0,27 (68) | -6,46 | -6,33 |
| **Noretindrona (c)** | Parte superior (%) | 96,14 | 8,44 (27) | 92,80 | 99,48 |
| | Parte inferior (%) | 2,38 | 5,02 (27) | 0,40 | 4,37 |
| | Pendiente de Hill | -1,41 | 0,32 (27) | -1,53 | -1,28 |
| | Log $CI_{50}$ (M) | -5,73 | 0,27 (27) | -5,84 | -5,62 |

(a) Los valores de la media (n) ± desviación típica (DT) se calcularon utilizando estimaciones de los parámetros de ajuste de la curva (ecuación de Hill de 4 parámetros) con tandas de testigos realizadas en cuatro laboratorios durante el estudio de validación (véase el anexo N de la referencia 2).

(b) Los intervalos de confianza del 95 % se aportan como guía para los criterios de aceptabilidad.

(c) El ensayo de noretindrona era opcional para la subtarea 4 durante el estudio de validación (en la referencia 2, véase la subtarea 4). Así pues, los valores de la media ± DT (n) se calcularon utilizando estimaciones de ajuste de la curva (ecuación de Hill de 4 parámetros) en relación con tandas de control realizadas en dos laboratorios.
*El intervalo de la $CI_{50}$ dependerá de la Kd del preparado del receptor y de la concentración de ligando radiomarcado utilizada en cada laboratorio. Será aceptable un ajuste adecuado del intervalo de la $CI_{50}$ sobre la base de las condiciones utilizadas para realizar el ensayo.*

**Demostración del comportamiento del laboratorio**

10. Véanse los puntos 17 y 18 y el cuadro 2 de la sección «**COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER** » de este método de ensayo. Cada ensayo (unión de saturación y de competencia) debe consistir en tres tandas independientes (es decir, con diluciones nuevas del receptor, de los productos y de los reactivos) en días diferentes, y cada tanda debe contener tres réplicas.

**Determinación de la concentración del receptor (hrERα)**

11. La concentración del receptor activo varía ligeramente en función del lote y de las condiciones de conservación. Por este motivo, debe determinarse la concentración del receptor activo tal como se recibe del proveedor. Esto dará la concentración adecuada del receptor activo en el momento de realizar la tanda.

12. En condiciones correspondientes a la unión de competencia (es decir, [$^3$H]-estradiol 1 nM), deben incubarse concentraciones nominales del receptor de 0,25, 0,5, 0,75 y 1 nM en ausencia (unión total) y presencia (unión inespecífica) de estradiol no marcado 1 μM. La unión específica, calculada como la diferencia de unión total e inespecífica, se representa frente a la concentración nominal del receptor. La concentración del receptor que da valores de unión específica correspondientes al 20 % de la sustancia radiomarcada añadida está relacionada con la correspondiente concentración nominal del receptor, y esta concentración del receptor debe utilizarse para los experimentos de unión de saturación y de competencia. Con frecuencia, una concentración final del rhER de 0,5 nM cumplirá esta condición.

▼M8

13. Si el criterio del 20 % no puede cumplirse de forma reiterada, deberá comprobarse si no se encuentran posibles errores en la configuración experimental. Si no se cumple el criterio del 20 %, puede deberse a que en el lote del recombinante hay muy poco de receptor activo, y en tal caso debe considerarse el uso de otro lote del receptor.

**Ensayo de saturación**

14. Deben evaluarse por triplicado ocho concentraciones cada vez mayores de [$^3$H]17β-estradiol, en las tres condiciones siguientes (véase el cuadro 2):

— En ausencia de 17β-estradiol no marcado y presencia de ER. Se trata de la determinación de la unión total por medida de la radiactividad en los pocillos que solo tienen [$^3$H]17β-estradiol.

— En presencia de una concentración de 17-β-estradiol no marcado que supera 1000 veces la concentración de 17β-estradiol marcado y en presencia del ER. El propósito de esta condición es saturar los puntos activos de unión con 17β-estradiol no marcado y, midiendo la radiactividad en los pocillos, determinar la unión inespecífica. Se considera que el eventual estradiol marcado restante que pueda unirse al receptor se une a un punto de unión inespecífica, ya que el estradiol no marcado debe estar a una concentración tan elevada que esté unido a todos los puntos específicos disponibles del receptor.

— En ausencia de 17β-estradiol no marcado y ausencia de ER (determinación de la radiactividad total).

*Preparación de soluciones de [$^3$H]17β-estradiol y de 17β-estradiol no marcado*

15. Deben prepararse diluciones de [$^3$H]17β-estradiol añadiendo solución amortiguadora de ensayo a una solución madre 12 nM de [$^3$H]17β-estradiol para obtener concentraciones inicialmente en el intervalo de 0,12 nM a 12 nM. Mediante la adición de 40 µl de estas soluciones a los pocillos de ensayo correspondientes de una placa de microvaloración de 96 pocillos (en un volumen final de 160 µl), se obtendrán las concentraciones finales de ensayo, entre 0,03 y 3,0 nM. La preparación de la solución amortiguadora de ensayo y de la solución madre de [$^3$H]17β-estradiol y sus diluciones, así como la determinación de las concentraciones, se describen con detalle en el protocolo FW (2).

16. Las diluciones de las soluciones etanólicas de 17β-estradiol deben prepararse añadiendo solución amortiguadora de ensayo para conseguir ocho concentraciones cada vez mayores que inicialmente van de 0,06 µM a 6 µM. Mediante la adición de 80 µl de estas soluciones a los pocillos de ensayo correspondientes de una placa de microvaloración de 96 pocillos (en un volumen final de 160 µl), se obtendrán las concentraciones finales de ensayo, que van de 0,03 µM hasta 3 µM. La concentración final de 17β-estradiol no marcado en los distintos pocillos de unión inespecífica debe ser 1 000 veces superior a la concentración de [$^3$H]17β-estradiol marcado. La preparación de diluciones de 17β-estradiol no marcado se describe en profundidad en el protocolo FW (2).

17. Debe utilizarse la concentración nominal del receptor que da una unión específica del 20 ± 5 % (véanse los puntos 12-13). La solución de hrERα debe prepararse inmediatamente antes de su utilización.

18. Las placas de microvaloración de 96 pocillos se preparan como se ilustra en el cuadro 2, con 3 réplicas por concentración. En el apéndice 2.2 figura un ejemplo de asignación a las placas de concentraciones y volúmenes de [$^3$H]17β-estradiol, de 17β-estradiol no marcado, de solución amortiguadora y de receptor.

▼M8

*Cuadro 2*

**Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de saturación**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 0,03 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 0,06 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 0,08 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 0,10 nM [$^3$H]E2 + ER | | | Unión total (disolvente) |
| B | 0,30 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 0,60 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 1,0 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 3,0 nM [$^3$H]E2 + ER | | | |
| C | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0,03 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,03 μM E2 | | | 0,06 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,06 μM E2 | | | 0,08 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,08 μM E2 | | | 0,10 nM [$^3$H]E2 + E2 0,10 μM | | | Unión inespecífica |
| E | 0,30 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,30 μM E2 | | | 0,60 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,60 μM E2 | | | 1,0 nM [$^3$ H]E2 + ER + 1,0 μM E2 | | | 3,0 nM [$^3$H]E2 + ER + 3,0 μM E2 | | | |
| F | | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | | |

[$^3$H]E2: [$^3$H]17β-Estradiol.
ER: Receptor estrogénico.
E2: 17β-Estradiol no marcado.

19. Las placas de microvaloración del ensayo deben incubarse a una temperatura de entre 2º y 8ºC durante entre 16 y 20 horas y colocarse en un rotador durante el período de incubación.

*Medición del [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα*

20. El [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα debe separarse del [$^3$H]17β-estradiol libre mediante la adición a cada pocillo de 80 μl de suspensión fría de DCC, seguida de agitación de las placas de microvaloración durante 10 minutos y de centrifugación durante 10 minutos a unas 2 500 rpm. Para reducir al mínimo la disociación de [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα durante este proceso, es sumamente importante que la temperatura de las soluciones amortiguadoras y de los pocillos del ensayo se mantenga entre 2 y 8ºC, y que cada paso se lleve a cabo con rapidez. Para tratar las placas de forma eficiente y rápida se necesita un agitador de placas de microvaloración.

21. A continuación, se deben tomar 50 μl del sobrenadante que contiene el [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα con muchísimo cuidado para evitar cualquier contaminación de los pocillos por contacto con la suspensión de DCC, y deben colocarse en una segunda placa de microvaloración.

22. A continuación, deben añadirse a cada pocillo (A1-B12 y D1 a E12) 200 μl del líquido de centelleo, capaces de convertir la energía cinética de las emisiones nucleares en energía luminosa. Los pocillos G1-H12 (identificados como dpm totales) contienen diluciones seriadas del [$^3$H]17β-estradiol (40 μl) que deben ponerse directamente en el líquido de centelleo de los pocillos de la placa de medición, como se indica en el cuadro 3; es decir, estos pocillos contienen solo 200 μl del líquido de centelleo y la dilución adecuada del [$^3$H]17β-estradiol. Estas medidas muestran cuánto [$^3$H]17β-estradiol medido en dpm se había añadido a cada conjunto de pocillos en relación con la unión total y con la unión inespecífica.

▼M8

*Cuadro 3*

**Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de saturación, medición de la radiactividad**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 0,03 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 0,06 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 0,08 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 0,10 nM [$^3$H]E2 + ER | | | Unión total (disolvente) |
| B | 0,30 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 0,60 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 1,0 nM [$^3$H]E2 + ER | | | 3,0 nM [$^3$H]E2 + ER | | | |
| C | | | | | | | | | | | | | |
| D | 0,03 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,03 µM E2 | | | 0,06 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,06 µM E2 | | | 0,08 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,08 µM E2 | | | 0,10 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,10 µM E2 | | | Unión inespecífica |
| E | 0,30 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,30 µM E2 | | | 0,60 nM [$^3$H]E2 + ER + 0,60 µM E2 | | | 1,0 nM [$^3$H]E2 + ER + 1,0 µM E2 | | | 3,0 nM [$^3$H]E2 + ER + + 3,0 µM E2 | | | |
| F | | | | | | | | | | | | | |
| G | 0,03 nM [$^3$H]E2 (dpm totales) | | | 0,06 nM [$^3$H]E2 | | | 0,08 nM [$^3$H]E2 | | | 0,10 nM [$^3$H]E2 | | | dpm totales (*) |
| H | 0,30 nM [$^3$H]E2 | | | 0,60 nM [$^3$H]E2 | | | 1,0 nM [$^3$H]E2 | | | 3,0 nM [$^3$H]E2 | | | |

[$^3$H]E2: [$^3$H]17β-estradiol.
ER: Receptor estrogénico.
E2: 17β-Estradiol no marcado.
dpm: Desintegraciones por minuto.
(*) Las diluciones en serie de estradiol marcado con [$^3$H] deben añadirse directamente a 200 µl de líquido de centelleo en los pocillos G1 - H12.

23. La medición debe comenzar cuando hayan pasado al menos 2 horas y el tiempo de recuento debe ser de 40 minutos por pocillo. Para la determinación de las dpm/pocillo con corrección de la atenuación debe utilizarse un contador de centelleo para placas de microvaloración. Si no se dispone de este contador de centelleo para placas de microvaloración, se puede recurrir también a medir las muestras con un contador convencional. En estas condiciones, puede considerarse una reducción del tiempo de recuento.

**Ensayo de unión de competencia**

24. El ensayo de unión de competencia mide la unión de una única concentración de [$^3$H]17β-estradiol en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema. Deben utilizarse en paralelo tres réplicas de cada concentración en cada tanda. Además, deben realizarse tres tandas no simultáneas con cada producto problema. El ensayo debe configurarse en una o más placas de microvaloración con 96 pocillos.

*Testigos*

25. Al realizar el ensayo, deben incluirse en cada experimento testigos y disolventes en paralelo (es decir, estrógeno de referencia, ligando débil y no ligando). Deben incluirse en una placa de cada tanda todos los puntos que forman las curvas de concentración completas del estrógeno de referencia y de los testigos (es decir, ligando débil y no ligando). Todas las demás placas deben contener: i) una concentración elevada (desplazamiento máximo) y una media (aproximadamente la $CI_{50}$) tanto de E2 como del ligando débil, por triplicado; ii) el testigo de disolvente y el ligando inespecífico, cada uno por triplicado. En la referencia 2 (anexo K, protocolo del ensayo FW) se describen los procedimientos para la preparación de las soluciones amortiguadoras, testigo, de [$^3$H]17β-estradiol, de hrERα y de producto problema.

▼**M8**

*Control del disolvente:*

26. El control del disolvente indica que este no interactúa con el sistema de ensayo y que también mide la unión total (*total binding*, TB). El etanol es el disolvente preferido. Si la concentración más alta del producto problema no es soluble en etanol, también se podrá utilizar DMSO. La concentración de etanol o DMSO, si se utiliza este, en los pocillos del ensayo final es del 1,5 % y no puede ser superior al 2 %.

*Testigo de la solución amortiguadora:*

27. El testigo de la solución amortiguadora (*buffer control*, BC) no debe contener ni disolvente ni producto problema, pero sí todos los demás componentes del ensayo. Los resultados del testigo de la solución amortiguadora se comparan con el control del disolvente para verificar que el disolvente utilizado no afecta al sistema de ensayo.

*Ligando fuerte (estrógeno de referencia)*

28. El 17β-estradiol (n.º CAS 50-28-2) es el ligando endógeno y se une con gran afinidad al ER, subtipo alfa. Debe prepararse una curva patrón con 17β-estradiol no marcado para cada uno de los ensayos de unión de competencia al hrERα, a fin de permitir una evaluación de la variabilidad cuando se realice el ensayo a lo largo del tiempo dentro del mismo laboratorio. Deben prepararse en etanol ocho soluciones de 17β-estradiol no marcado, con concentraciones en los pocillos del ensayo comprendidas entre 100 nM y 10 pM [-7 (log M) hasta -11 (log M)], separadas como sigue: -7 (log M), -8 (log M), -8,5 (log M), -9 (log M), -9,5 (log M), -10 (log M), -11 (logM). La concentración más elevada de 17β-estradiol no marcado (1 μM) también sirve de indicador de unión inespecífica. Esta concentración se distingue con el rótulo «NSB» (*non-specific binding*) en el cuadro 4, aunque también forma parte de la curva patrón.

*Ligando débil*

29. Debe incluirse un ligando débil [noretinodrel (n.º CAS 68-23-5) o noretindrona (n.º CAS 68-22-4)] para demostrar la sensibilidad de cada experimento y permitir una evaluación de la variabilidad cuando se realice el ensayo a lo largo del tiempo. Deben prepararse en etanol ocho soluciones del ligando débil, con concentraciones en los pocillos del ensayo comprendidas entre 3 nM y 30 μM [desde -8,5 (log M) hasta -4,5 (log M)], separadas como sigue: [-4,5 (log M), -5 (log M), -5,5 (log M), -6 (log M), -9,5 (log M), -7,5 (log M), -8,5 (logM)].

*No ligando*

30. Debe utilizarse como testigo negativo (no ligando) el octiltrietoxisilano (OTES, n.º CAS 2943-75-1). Aporta la garantía de que el ensayo, tal como se realiza, detecta si los productos problema no se unen al hrERα. Deben prepararse en etanol ocho soluciones del no ligando, con concentraciones en los pocillos del ensayo comprendidas entre 0,1 nM y 1 000 μM [desde -10 (log M) hasta -3 (log M)], con incrementos logarítmicos. Puede utilizarse también como no ligando testigo el ftalato de di-n-butilo (DBP). Se ha visto que su solubilidad máxima es de -4 (log M).

*Concentración del hrERα*

31. Debe utilizarse la cantidad del receptor que da una unión específica del 20 ± 5 % de radioligando 1 nM (véanse los puntos 12-13 del apéndice 2). La solución de hrERα debe prepararse inmediatamente antes de su utilización.

*[$^3$H]17β-estradiol*

32. La concentración de [$^3$H]17β-estradiol en los pocillos de ensayo debe ser de 1,0 nM.

▼M8

*Productos problema*

33. En primer lugar, es necesario realizar un ensayo de solubilidad para determinar el límite de solubilidad de cada producto problema y para identificar el intervalo adecuado de concentraciones que se ha de utilizar al aplicar el protocolo del ensayo. El límite de solubilidad de cada producto problema se determina inicialmente en el disolvente y se confirma después en las condiciones del ensayo. La concentración final utilizada en el ensayo no deberá ser superior a 1 mM. La determinación del intervalo de concentraciones consiste en someter a ensayo un testigo de disolvente, junto con ocho diluciones logarítmicas en serie, a partir de la concentración máxima aceptable (por ejemplo, 1 mM o menos, sobre la base del límite de solubilidad), y anotar la presencia de turbidez o precipitado (véase el punto 35). El producto problema debe ensayarse utilizando curvas con ocho concentraciones a intervalos logarítmicos, definidas en el ensayo previo de detección del intervalo de concentraciones. Las concentraciones en los experimentos segundo y tercero deben ajustarse según convenga para caracterizar mejor la curva concentración-respuesta.

34. Las diluciones del producto problema deben prepararse en el disolvente adecuado (véase el punto 26 del apéndice 2). Si la concentración más elevada del producto problema no fuera soluble en etanol o DMSO, y la adición de más disolvente hiciera que la concentración de disolvente en el tubo final fuera mayor que el límite aceptable, la concentración más elevada podría reducirse a la concentración inmediatamente inferior. En este caso, podría añadirse una concentración adicional en el extremo inferior de la serie de concentraciones. Las demás concentraciones de la serie deben permanecer inalteradas.

35. Las soluciones del producto problema deben ser objeto de un estrecho seguimiento cuando se añaden al pocillo del ensayo, ya que el producto problema puede provocar una precipitación cuando se añade al pocillo del ensayo. Los datos de todos los pocillos que contengan precipitado deben quedar excluidos del ajuste de la curva, y debe anotarse el motivo de la exclusión de los datos.

36. Si hay información previa de otras fuentes que proporcionen el log $CI_{50}$ de un producto problema, puede ser adecuado espaciar geométricamente las diluciones (es decir, 0,5 unidades logarítmicas alrededor del log $CI_{50}$ previsto. El resultado final debe reflejar la suficiente amplitud de las concentraciones a ambos lados del log $CI_{50}$, incluidos la «parte superior» y la «parte inferior», de manera que la curva de la unión pueda caracterizarse adecuadamente.

*Organización de las placas del ensayo*

37. Deben prepararse placas de microvaloración etiquetadas que tengan en cuenta las incubaciones séxtuples con códigos para el control del disolvente, la concentración más elevada del estrógeno de referencia, que también sirve de indicador de la unión inespecífica (NSB), y el testigo de la solución amortiguadora, y que tengan en cuenta las incubaciones por triplicado con códigos para cada una de las ocho concentraciones del testigo no ligando (octiltrietoxisilano), las siete concentraciones inferiores del estrógeno de referencia, las ocho concentraciones del ligando débil y las ocho concentraciones de cada producto problema (*test chemical*, TC). En el cuadro 4 a continuación figura un ejemplo de diagrama de la disposición de la placa para las curvas de concentración completas correspondientes al estrógeno de referencia y al testigo. Se utilizan placas de microvaloración adicionales para los productos problema y deben incluir testigos de las placas, es decir: 1) una concentración elevada (desplazamiento máximo) y media (aproximadamente la $CI_{50}$) tanto del E2 como de un ligando débil, por triplicado; 2) el testigo

▼M8

de disolvente y el ligando inespecífico, cada uno por sextuplicado (cuadro 5). En el apéndice 2.3 se presenta un ejemplo de hoja de cálculo de la configuración de la placa de microvaloración para el ensayo de competencia con tres productos problema desconocidos. Las concentraciones indicadas en los cuadros 4 y 5 son las concentraciones finales del ensayo. La concentración máxima de E2 debe ser $1 \times 10^{-7}$ M y la del ligando débil debe ser la concentración más elevada utilizada para este en la placa 1. La concentración $CI_{50}$ debe ser determinada por el laboratorio a partir de su base de datos de testigos históricos. Se espera que este valor sea similar al observado en los estudios de validación (véase el cuadro 1).

*Cuadro 4*

**Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de competencia, curvas completas de concentración del estrógeno de referencia y de los testigos (placa 1)**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | TB (solo disolvente) | | | TB (solo disolvente) | | | NSB | | | NSB | | |
| B | E2 ($1 \times 10^{-7}$) | | | E2 ($1 \times 10^{-8}$) | | | E2 ($1 \times 10^{-8,5}$) | | | E2 ($1 \times 10^{-9}$) | | |
| C | E2 ($1 \times 10^{-9,5}$) | | | E2 ($1 \times 10^{-10}$) | | | E2 ($1 \times 10^{-11}$) | | | Blanco (*) | | |
| D | NE ($1 \times 10^{-4,5}$) | | | NE ($1 \times 10^{-5}$) | | | NE ($1 \times 10^{-5,5}$) | | | NE ($1 \times 10^{-6}$) | | |
| E | NE ($1 \times 10^{-6,5}$) | | | NE ($1 \times 10^{-7}$) | | | NE ($1 \times 10^{-7,5}$) | | | NE ($1 \times 10^{-8,5}$) | | |
| F | OTES ($1 \times 10^{-3}$) | | | OTES ($1 \times 10^{-4}$) | | | OTES ($1 \times 10^{-5}$) | | | OTES ($1 \times 10^{-6}$) | | |
| G | OTES ($1 \times 10^{-7}$) | | | OTES ($1 \times 10^{-8}$) | | | OTES ($1 \times 10^{-9}$) | | | OTES ($1 \times 10^{-10}$) | | |
| H | Blanco (de marcado) (**) | | | Blanco (de marcado) (**) | | | Testigo de la solución amortiguadora | | | Testigo de la solución amortiguadora | | |

En este ejemplo, el ligando débil es el noretinodrel (NE).
(*) Blanco real, pocillo no utilizado.
(**) Blanco no utilizado durante la incubación, pero sí utilizado para confirmar la radiactividad total añadida.

*Cuadro 5*

**Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de competencia, curvas completas de concentración de los productos problema y de los testigos de las placas.**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | TB (solo disolvente) | | | TB (solo disolvente) | | | NSB | | | NSB | | |
| B | TC1 ($1 \times 10^{-3}$) | | | TC1 ($1 \times 10^{-4}$) | | | TC1 ($1 \times 10^{-5}$) | | | TC1 ($1 \times 10^{-6}$) | | |
| C | TC1 ($1 \times 10^{-7}$) | | | TC1 ($1 \times 10^{-8}$) | | | TC1 ($1 \times 10^{-9}$) | | | TC1 ($1 \times 10^{-10}$) | | |
| D | TC2 ($1 \times 10^{-3}$) | | | TC2 ($1 \times 10^{-4}$) | | | TC2 ($1 \times 10^{-5}$) | | | TC2 ($1 \times 10^{-6}$) | | |
| E | TC2 ($1 \times 10^{-7}$) | | | TC2 ($1 \times 10^{-8}$) | | | TC2 ($1 \times 10^{-9}$) | | | TC2 ($1 \times 10^{-10}$) | | |
| F | TC3 ($1 \times 10^{-3}$) | | | TC3 ($1 \times 10^{-4}$) | | | TC3 ($1 \times 10^{-5}$) | | | TC3 ($1 \times 10^{-6}$) | | |
| G | TC3 ($1 \times 10^{-7}$) | | | TC3 ($1 \times 10^{-8}$) | | | TC3 ($1 \times 10^{-9}$) | | | TC3 ($1 \times 10^{-10}$) | | |
| H | NE ($CI_{50}$) | | | NE ($1 \times 10^{-4,5}$) | | | E2 ($CI_{50}$) | | | E2 ($1 \times 10^{-7}$) | | |

En este ejemplo, el ligando débil es el noretinodrel (NE).

▼M8

*Terminación del ensayo de unión de competencia*

38. Como se muestra en el cuadro 6, deben añadirse a los pocillos 80 µl del testigo de disolvente, del testigo de la solución amortiguadora, del estrógeno de referencia, del ligando débil, del no ligando y de los productos problema preparados en la solución amortiguadora de ensayo. A continuación, deben añadirse a cada pocillo 40 µl de una solución 4 nM de [$^3$H]17β-estradiol. Tras una rotación suave durante entre 10 y 15 minutos, a una temperatura de entre 2º y 8ºC, deben añadirse 40 µl de solución de hrERα. Las placas de microvaloración del ensayo deben incubarse a una temperatura de entre 2º y 8ºC durante entre 16 y 20 horas y colocarse en un rotador durante el período de incubación.

*Cuadro 6*

**Volumen de los componentes del ensayo para las placas de un ensayo de unión de competencia, placas de microvaloración.**

| Volumen (µl) | Componente |
|---|---|
| 80 | 17β-Estradiol no marcado, noretinodrel, OTES, productos problema, disolvente o solución amortiguadora |
| 40 | Solución 4 nM de [$^3$H]17β-estradiol |
| 40 | Solución de hrERα, concentración según se haya determinado |
| ***160*** | ***Volumen total en cada pocillo del ensayo*** |

39. A continuación debe llevarse a cabo la cuantificación del [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα, tras la separación del [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα respecto al [$^3$H]17β-estradiol libre mediante la adición de 80 µl de suspensión fría de DCC a cada pocillo, como se describe en los puntos 20 a 23, para el ensayo de unión de saturación.

40. Los pocillos H1-6 [identificados como blanco (de marcado) en el cuadro 4] presentan las dpm del estradiol marcado con [$^3$H] en 40 µl. La alícuota de 40 µl debe añadirse directamente al líquido de centelleo en los pocillos H1 - H6.

**Criterios de aceptabilidad**

*Ensayo de unión de saturación*

41. La curva de unión específica debe alcanzar una meseta a medida que se utilizan concentraciones crecientes de [$^3$H]17β-estradiol, lo que indica la saturación del hrERα con el ligando.

42. La unión específica a la concentración 1 nM de [$^3$H]17β-estradiol debe situarse en el intervalo aceptable del 15 % - 25 % de la radiactividad total medida media que se ha añadido en todas las tandas. Pueden aceptarse ligeras salidas fuera de este intervalo, pero si las tandas están sistemáticamente fuera del mismo o una tanda concreta se sitúa significativamente fuera de este intervalo, debe ajustarse la concentración de proteínas y repetirse el ensayo de saturación.

43. Los datos deben corresponder a una gráfica lineal de Scatchard.

44. La unión inespecífica no debe ser excesiva. El valor de la unión inespecífica debe ser típicamente < 35 % de la unión total. Sin embargo, la proporción puede superar ocasionalmente este límite cuando se miden valores muy bajos de dpm con la concentración más baja de 17β-estradiol radiomarcado.

▼**M8**

*Ensayo de unión de competencia*

45. El aumento de las concentraciones de 17β-estradiol no marcado debe desplazar el [$^3$H]17β-estradiol del receptor de manera coherente con una unión de competencia a un solo punto.

46. El valor de $CI_{50}$ para el estrógeno de referencia (es decir, el 17β-estradiol) debe ser aproximadamente igual a la concentración molar del [$^3$H]17β-estradiol más la Kd determinada a partir del ensayo de unión de saturación.

47. La unión específica total debe estar sistemáticamente dentro del intervalo aceptable del 20 ± 5 % cuando la concentración medida media de la radiactividad total añadida a cada pocillo es de 1 nM en todas las tandas. Pueden aceptarse ligeras salidas fuera de este intervalo, pero si las tandas están sistemáticamente fuera del mismo o una tanda concreta se sitúa significativamente fuera de este intervalo, debe ajustarse la concentración de proteínas.

48. El disolvente no debe alterar la sensibilidad ni la reproducibilidad del ensayo. Los resultados del control del disolvente (pocillos TB) se comparan con el testigo de la solución amortiguadora para verificar que el disolvente utilizado no afecta al sistema de ensayo. Los resultados del testigo de la TB y de la solución amortiguadora deben ser comparables si el disolvente no produce ningún efecto sobre el ensayo.

49. El no ligando no debe desplazar más del 25 % del [$^3$H]17β-estradiol del hrERα cuando se somete a ensayo hasta la concentración de $10^{-3}$ M (OTES) o $10^{-4}$ M (DBP).

50. Se han establecido criterios de comportamiento para el estrógeno de referencia y dos ligandos débiles (por ejemplo, noretinodrel, noretindrona) utilizando los datos del estudio de validación del ensayo de FW de unión al hrER (anexo N de la referencia 2). Se aportan los intervalos de confianza del 95 % para la media (n) ± DT de todas las tandas de los testigos en todos los laboratorios participantes en el estudio de validación. Se calcularon intervalos de confianza del 95 % para los parámetros de ajuste de las curvas (es decir, parte superior, parte inferior, pendiente de Hill, log $CI_{50}$) en relación con el estrógeno de referencia y los ligandos débiles, y para el $\log_{10}$ RBA de los ligandos débiles en relación con el estrógeno de referencia, y se proporcionan como criterios de comportamiento respecto a los testigos positivos. En el cuadro 1 se ofrecen los intervalos previstos para los parámetros de ajuste de las curvas, que pueden utilizarse como criterios de comportamiento. En la práctica, el intervalo de la $CI_{50}$ puede variar ligeramente según la Kd del preparado del receptor y la concentración del ligando.

51. No se han establecido criterios de comportamiento sobre los parámetros de ajuste de las curvas en relación con los productos problema debido a la amplia gama de productos problema que puede haber y a la variación de las posibles afinidades y resultados (por ejemplo, ajuste de la curva completa o de la curva parcial, o sin ajuste alguno). Sin embargo, a la hora de revisar los resultados de cada tanda correspondientes a un producto problema, debe aplicarse un juicio profesional. Debe utilizarse un intervalo suficiente de concentraciones del producto problema para definir claramente la parte superior (p. ej., 90 - 100 % de unión) de la curva de competencia. La variabilidad entre las réplicas de cada concentración del producto problema, así como entre las tres tandas en momentos diferentes, debe ser razonable y científicamente justificable. Los testigos de cada tanda de un producto problema deben aproximarse a las medidas de comportamiento notificadas para este ensayo de FW y deben ser coherentes con los datos históricos de los testigos de cada laboratorio respectivo.

▼M8

ANÁLISIS DE LOS DATOS

**Ensayo de unión de saturación**

52. Se mide tanto la unión total como la inespecífica. A partir de estos valores, se calcula la unión específica con concentraciones en aumento de [$^3$H]17β-estradiol en condiciones de equilibrio, restando la inespecífica de la total. La gráfica de la unión específica frente a la concentración de [$^3$H]17β-estradiol debe alcanzar una meseta para la unión específica máxima, lo cual indica la saturación del hrERα con el [$^3$H]17β-estradiol. Por otra parte, el análisis de los datos debe documentar la unión del [$^3$H]17β-estradiol a un solo punto de unión de elevada afinidad. En la curva de unión de saturación deben ponerse de manifiesto la unión inespecífica, la total y la específica. El posterior análisis de estos datos debe utilizar una regresión no lineal (por ejemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) con una representación final de los datos como gráfica de Scatchard.

53. El análisis de los datos debe determinar los parámetros Bmax y Kd a partir solo de los datos de unión total, aceptando que la unión inespecífica es lineal, salvo que se justifique utilizar otro método. Además, a la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. Debe indicarse el método elegido para la regresión sólida. Al determinar los parámetros Bmax y Kd a partir de los datos de la unión de saturación, siempre debe aplicarse una corrección para tener en cuenta el agotamiento de los ligandos (p. ej., utilizando el método de Swillens, 1995).

**Ensayo de unión de competencia**

54. La curva de la unión de competencia se representa gráficamente como la unión específica del [$^3$H]17β-estradiol frente a la concentración (unidades $\log_{10}$) del competidor. La concentración del producto problema que inhibe el 50 % de la unión máxima específica del [$^3$H]17β-estradiol es el valor de la $CI_{50}$.

55. Deben estimarse los valores de log $CI_{50}$ de los testigos positivos (p. ej., el estrógeno de referencia y el ligando débil), utilizando un programa informático adecuado de ajuste de curvas no lineales para ajustarse a una ecuación de Hill de cuatro parámetros (p. ej., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). La parte superior, la parte inferior, la pendiente y log $CI_{50}$ deben dejarse, por lo general, sin restricciones cuando se ajustan estas curvas. A la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. No debe utilizarse ninguna corrección por el agotamiento de los ligandos. Tras el análisis inicial, debe revisarse cada curva de los ligandos para garantizar que se ajusta adecuadamente al modelo. La afinidad relativa de unión (RBA) del ligando débil debe calcularse como porcentaje del log $CI_{50}$ del ligando débil respecto al log $CI_{50}$ del 17β-estradiol. Los resultados de los testigos positivos y del testigo de no ligando deben evaluarse utilizando las medidas del comportamiento del ensayo de los puntos 45 - 50 del presente apéndice 2.

56. Los datos de todos los productos problema deben analizarse utilizando un enfoque gradual para garantizar que los datos se analizan de forma adecuada y que cada curva de unión de competencia se clasifica correctamente. Se recomienda que cada tanda con el producto problema se someta inicialmente a un análisis de datos normalizado idéntico al utilizado con el estrógeno de referencia y los testigos de ligandos débiles (véase el punto 55 anterior). Tras este análisis inicial, debe llevarse a cabo una revisión técnica de los parámetros de ajuste de las curvas, así como un examen visual sobre el grado de calidad del ajuste de los datos con la curva de la unión de competencia generada en cada tanda. Durante esta revisión técnica, la observación de una disminución dependiente de la concentración en el porcentaje de [$^3$H]17β-estradiol unido específicamente, la de una baja variabilidad entre las réplicas técnicas de cada concentración de producto, y la de la coherencia de los parámetros de ajuste entre las tres tandas son una buena indicación de que el ensayo y los análisis de datos se han llevado a cabo adecuadamente.

▼M8

**Interpretación de los datos**

57. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que un producto problema es un ligando del hrERα si puede ajustarse una curva de unión y el punto más bajo de la curva de respuesta dentro del intervalo de los datos es inferior al 50 % (figura 1).

58. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es no ligando del hrERα si:

— puede ajustarse una curva de unión y el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada dentro del intervalo de datos es superior al 75 %, o

— no puede ajustarse una curva de unión y la unión porcentual media sin suavizar más baja entre los grupos de concentración de los datos es superior al 75 %.

59. Los productos problema se consideran dudosos si no se cumple ninguna de las condiciones anteriores (por ejemplo, el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada se sitúa entre el 76 y el 51 %).

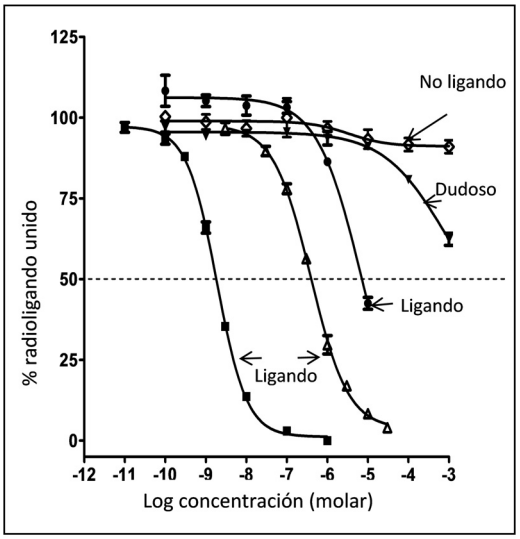
*Cuadro 7*

**Criterios de asignación de la clasificación a un producto problema sobre la base de una curva de unión de competencia.**

| Clasificación | Criterios |
|---|---|
| Ligando[a] | Puede ajustarse una curva de unión.<br>El **punto más bajo de la curva de respuesta dentro del intervalo de datos es inferior al 50 %**. |
| No ligando[b] | Si puede ajustarse una curva de unión,<br>el **punto más bajo de la curva de respuesta ajustada dentro del intervalo de datos es superior al 75 %**.<br>Si no puede ajustarse una curva de unión,<br>la **unión porcentual media sin suavizar más baja entre los grupos de concentración de los datos es superior al 75 %**. |
| Dudoso[c] | Cualquier producto sometido al ensayo que no sea ni ligando ni no ligando<br>(p. ej., el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada se sitúa entre el 76 y el 51 %). |

*Figura 1*

**Ejemplos de clasificación de productos problema utilizando una curva de unión de competencia.**



▼M8

60. Se combinan las diversas tandas realizadas con un producto problema dentro de un laboratorio, Puede ajustarse una curva de unión.asignando un valor numérico a cada tanda y promediando entre ellas, como se muestra en el cuadro 8. Los resultados de las tandas combinadas dentro de cada laboratorio se comparan con la clasificación prevista de cada producto problema.

*Cuadro 8*

**Método de clasificación del producto problema mediante varias tandas dentro de un laboratorio**

| **Asignar valor a cada tanda:** | |
|---|---|
| **Clasificación** | **Valor numérico** |
| Ligando | 2 |
| Dudoso | 1 |
| No ligando | 0 |
| **Clasificar según la media de los valores numéricos de las tandas:** | |
| **Clasificación** | **Valor numérico** |
| Ligando | Media ≥ 1,5 |
| Dudoso | 0,5 ≤ Media < 1,5 |
| No ligando | Media < 0,5 |

INFORME DEL ENSAYO

61. Véase el punto 24 de la sección **«COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER»** de este método de ensayo.

▼**M8**

*Apéndice 2.1*

RELACIÓN DE TÉRMINOS

**[$^3$H]E2:** 17β-Estradiol radiomarcado con tritio.

**DCC:** Carbón recubierto de dextrano.

**E2:** 17β-Estradiol no marcado (inerte).

**Solución amortiguadora del ensayo:** Tris 10 mM, 10 mg de seroalbúmina bovina / ml, DTT 2 mM, glicerol al 10 %, leupeptina 0,2 mM, pH 7,5.

**hrERα:** Receptor estrogénico recombinante humano alfa.

**Réplica:** Cada uno de los diversos pocillos que tienen el mismo contenido a la misma concentración y se someten a ensayo simultáneamente dentro de una misma tanda. En este protocolo, cada concentración del producto problema se somete al ensayo por triplicado; es decir, hay tres réplicas que se someten simultáneamente al ensayo con cada concentración del producto problema.

**Tanda:** Conjunto completo de pocillos de ensayo en placas de microvaloración sometidos a ensayo a la vez, que aporta toda la información necesaria para caracterizar la unión de un producto problema al hrERα (a saber, [$^3$H]17β-estradiol total añadido al pocillo de ensayo, unión máxima del [$^3$H]17β-estradiol al hrERα, unión inespecífica, y unión total a diversas concentraciones del producto problema). Una tanda podría consistir simplemente en un solo pocillo (es decir, una réplica) por concentración, pero, puesto que este protocolo requiere que los ensayos se realicen por triplicado, una tanda estará compuesta por tres pocillos de ensayo por cada concentración. Además, este protocolo exige la realización de tres tandas independientes (es decir, no simultáneas) por producto.

▼**M8**

*Apéndice 2.2*

ENSAYO NORMAL DE SATURACIÓN CON [$^3$H]17B-ESTRADIOL CON TRES POCILLOS REPLICADOS

| **Ensayo normal de saturación con [3H]17β-estradiol con tres pocillos replicados** | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Posición** | **Réplica** | **Código de tipo de pocillo** | **Concentración inicial de E2 marcado (nM)** | **Volumen de E2 marcado (µl)** | **Concentración final de E2 marcado (nM)** | **Concentración inicial de E2 no marcado (µM)** | **Volumen de E2 no marcado (µl)** | **Concentración final de E2 no marcado (µM)** | **Volumen de solución amortiguadora (µl)** | **Volumen de receptor (µl)** | **Volumen total en los pocillos** |
| A1 | 1 | H | 0,12 | 40 | 0,03 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A2 | 2 | H | 0,12 | 40 | 0,03 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A3 | 3 | H | 0,12 | 40 | 0,03 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A4 | 1 | H | 0,24 | 40 | 0,06 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A5 | 2 | H | 0,24 | 40 | 0,06 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A6 | 3 | H | 0,24 | 40 | 0,06 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A7 | 1 | H | 0,32 | 40 | 0,08 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A8 | 2 | H | 0,32 | 40 | 0,08 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A9 | 3 | H | 0,32 | 40 | 0,08 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A10 | 1 | H | 0,40 | 40 | 0,10 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A11 | 2 | H | 0,40 | 40 | 0,10 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| A12 | 3 | H | 0,40 | 40 | 0,10 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B1 | 1 | H | 1,20 | 40 | 0,30 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B2 | 2 | H | 1,20 | 40 | 0,30 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B3 | 3 | H | 1,20 | 40 | 0,30 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B4 | 1 | H | 2,40 | 40 | 0,60 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B5 | 2 | H | 2,40 | 40 | 0,60 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B6 | 3 | H | 2,40 | 40 | 0,60 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B7 | 1 | H | 4,00 | 40 | 1,00 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B8 | 2 | H | 4,00 | 40 | 1,00 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |

▼**M8**

| Ensayo normal de saturación con [3H]17β-estradiol con tres pocillos replicados | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Posición** | **Réplica** | **Código de tipo de pocillo** | **Concentración inicial de E2 marcado (nM)** | **Volumen de E2 marcado (µl)** | **Concentración final de E2 marcado (nM)** | **Concentración inicial de E2 no marcado (µM)** | **Volumen de E2 no marcado (µl)** | **Concentración final de E2 no marcado (µM)** | **Volumen de solución amortiguadora (µl)** | **Volumen de receptor (µl)** | **Volumen total en los pocillos** |
| B9 | 3 | H | 4,00 | 40 | 1,00 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B10 | 1 | H | 12,00 | 40 | 3,00 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B11 | 2 | H | 12,00 | 40 | 3,00 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| B12 | 3 | H | 12,00 | 40 | 3,00 | — | — | — | 80 | 40 | 160 |
| D1 | 1 | HC | 0,12 | 40 | 0,03 | 0,06 | 80 | 0,03 | — | 40 | 160 |
| D2 | 2 | HC | 0,12 | 40 | 0,03 | 0,06 | 80 | 0,03 | — | 40 | 160 |
| D3 | 3 | HC | 0,12 | 40 | 0,03 | 0,06 | 80 | 0,03 | — | 40 | 160 |
| D4 | 1 | HC | 0,24 | 40 | 0,06 | 0,12 | 80 | 0,06 | — | 40 | 160 |
| D5 | 2 | HC | 0,24 | 40 | 0,06 | 0,12 | 80 | 0,06 | — | 40 | 160 |
| D6 | 3 | HC | 0,24 | 40 | 0,06 | 0,12 | 80 | 0,06 | — | 40 | 160 |
| D7 | 1 | HC | 0,32 | 40 | 0,08 | 0,16 | 80 | 0,08 | — | 40 | 160 |
| D8 | 2 | HC | 0,32 | 40 | 0,08 | 0,16 | 80 | 0,08 | — | 40 | 160 |
| D9 | 3 | HC | 0,32 | 40 | 0,08 | 0,16 | 80 | 0,08 | — | 40 | 160 |
| D10 | 1 | HC | 0,40 | 40 | 0,10 | 0,2 | 80 | 0,1 | — | 40 | 160 |
| D11 | 2 | HC | 0,40 | 40 | 0,10 | 0,2 | 80 | 0,1 | — | 40 | 160 |
| D12 | 3 | HC | 0,40 | 40 | 0,10 | 0,2 | 80 | 0,1 | — | 40 | 160 |
| E1 | 1 | HC | 1,20 | 40 | 0,30 | 0,6 | 80 | 0,3 | — | 40 | 160 |
| E2 | 2 | HC | 1,20 | 40 | 0,30 | 0,6 | 80 | 0,3 | — | 40 | 160 |
| E3 | 3 | HC | 1,20 | 40 | 0,30 | 0,6 | 80 | 0,3 | — | 40 | 160 |
| E4 | 1 | HC | 2,40 | 40 | 0,60 | 1,2 | 80 | 0,6 | — | 40 | 160 |
| E5 | 2 | HC | 2,40 | 40 | 0,60 | 1,2 | 80 | 0,6 | — | 40 | 160 |
| E6 | 3 | HC | 2,40 | 40 | 0,60 | 1,2 | 80 | 0,6 | — | 40 | 160 |

▼**M8**

| Ensayo normal de saturación con [3H]17β-estradiol con tres pocillos replicados | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Posición** | **Réplica** | **Código de tipo de pocillo** | **Concentración inicial de E2 marcado (nM)** | **Volumen de E2 marcado (µl)** | **Concentración final de E2 marcado (nM)** | **Concentración inicial de E2 no marcado (µM)** | **Volumen de E2 no marcado (µl)** | **Concentración final de E2 no marcado (µM)** | **Volumen de solución amortiguadora (µl)** | **Volumen de receptor (µl)** | **Volumen total en los pocillos** |
| E7 | 1 | HC | 4,00 | 40 | 1,00 | 2 | 80 | 1 | — | 40 | 160 |
| E8 | 2 | HC | 4,00 | 40 | 1,00 | 2 | 80 | 1 | — | 40 | 160 |
| E9 | 3 | HC | 4,00 | 40 | 1,00 | 2 | 80 | 1 | — | 40 | 160 |
| E10 | 1 | HC | 12,00 | 40 | 3,00 | 6 | 80 | 3 | — | 40 | 160 |
| E11 | 2 | HC | 12,00 | 40 | 3,00 | 6 | 80 | 3 | — | 40 | 160 |
| E12 | 3 | HC | 12,00 | 40 | 3,00 | 6 | 80 | 3 | — | 40 | 160 |
| G1 | 1 | Marcado | 0,12 | 40 | 0,03 | — | — | — | — | — | 40 |
| G2 | 2 | Marcado | 0,12 | 40 | 0,03 | — | — | — | — | — | 40 |
| G3 | 3 | Marcado | 0,12 | 40 | 0,03 | — | — | — | — | — | 40 |
| G4 | 1 | Marcado | 0,24 | 40 | 0,06 | — | — | — | — | — | 40 |
| G5 | 2 | Marcado | 0,24 | 40 | 0,06 | — | — | — | — | — | 40 |
| G6 | 3 | Marcado | 0,24 | 40 | 0,06 | — | — | — | — | — | 40 |
| G7 | 1 | Marcado | 0,32 | 40 | 0,08 | — | — | — | — | — | 40 |
| G8 | 2 | Marcado | 0,32 | 40 | 0,08 | — | — | — | — | — | 40 |
| G9 | 3 | Marcado | 0,32 | 40 | 0,08 | — | — | — | — | — | 40 |
| G10 | 1 | Marcado | 0,40 | 40 | 0,10 | — | — | — | — | — | 40 |
| G11 | 2 | Marcado | 0,40 | 40 | 0,10 | — | — | — | — | — | 40 |
| G12 | 3 | Marcado | 0,40 | 40 | 0,10 | — | — | — | — | — | 40 |

▼**M8**

**Ensayo normal de saturación con [3H]17β-estradiol con tres pocillos replicados**

| Posición | Réplica | Código de tipo de pocillo | Concentración inicial de E2 marcado (nM) | Volumen de E2 marcado (µl) | Concentración final de E2 marcado (nM) | Concentración inicial de E2 no marcado (µM) | Volumen de E2 no marcado (µl) | Concentración final de E2 no marcado (µM) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen de receptor (µl) | Volumen total en los pocillos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| H1 | 1 | Marcado | 1,20 | 40 | 0,30 | — | — | — | — | — | 40 |
| H2 | 2 | Marcado | 1,20 | 40 | 0,30 | — | — | — | — | — | 40 |
| H3 | 3 | Marcado | 1,20 | 40 | 0,30 | — | — | — | — | — | 40 |
| H4 | 1 | Marcado | 2,40 | 40 | 0,60 | — | — | — | — | — | 40 |
| H5 | 2 | Marcado | 2,40 | 40 | 0,60 | — | — | — | — | — | 40 |
| H6 | 3 | Marcado | 2,40 | 40 | 0,60 | — | — | — | — | — | 40 |
| H7 | 1 | Marcado | 4,00 | 40 | 1,00 | — | — | — | — | — | 40 |
| H8 | 2 | Marcado | 4,00 | 40 | 1,00 | — | — | — | — | — | 40 |
| H9 | 3 | Marcado | 4,00 | 40 | 1,00 | — | — | — | — | — | 40 |
| H10 | 1 | Marcado | 12,00 | 40 | 3,00 | — | — | — | — | — | 40 |
| H11 | 2 | Marcado | 12,00 | 40 | 3,00 | — | — | — | — | — | 40 |
| H12 | 3 | Marcado | 12,00 | 40 | 3,00 | — | — | — | — | — | 40 |

Obsérvese que los pocillos «marcados» están vacíos durante la incubación. Los 40 µl se añaden solo para el recuento de centelleo.

▼**M8**

*Apéndice 2.3*

DISTRIBUCIÓN DE LOS POCILLOS PARA EL ENSAYO DE UNIÓN DE COMPETENCIA

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | A1 | 1 | Unión total | TB | TB1 | — | 40 | | 40 | 80 | 160 | — |
| S | A2 | 2 | Unión total | TB | TB2 | — | 40 | | 40 | 80 | 160 | — |
| S | A3 | 3 | Unión total | TB | TB3 | — | 40 | | 40 | 80 | 160 | — |
| S | A4 | 1 | Unión total | TB | TB4 | — | 40 | | 40 | 80 | 160 | — |
| S | A5 | 2 | Unión total | TB | TB5 | — | 40 | | 40 | 80 | 160 | — |
| S | A6 | 3 | Unión total | TB | TB6 | — | 40 | | 40 | 80 | 160 | — |
| S | A7 | 1 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | A8 | 2 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | A9 | 3 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | A10 | 1 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | A11 | 2 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | A12 | 3 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | B1 | 1 | E2 no marcado | S | S1 | 2,00E-07 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| S | B2 | 2 | E2 no marcado | S | S1 | 2,00E-07 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| S | B3 | 3 | E2 no marcado | S | S1 | 2,00E-07 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| S | B4 | 1 | E2 no marcado | S | S2 | 2,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | B5 | 2 | E2 no marcado | S | S2 | 2,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| S | B6 | 3 | E2 no marcado | S | S2 | 2,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| S | B7 | 1 | E2 no marcado | S | S3 | 6,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-09 |
| S | B8 | 2 | E2 no marcado | S | S3 | 6,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-09 |
| S | B9 | 3 | E2 no marcado | S | S3 | 6,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-09 |
| S | B10 | 1 | E2 no marcado | S | S4 | 2,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| S | B11 | 2 | E2 no marcado | S | S4 | 2,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| S | B12 | 3 | E2 no marcado | S | S4 | 2,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| S | C1 | 1 | E2 no marcado | S | S5 | 6,00E-10 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-10 |
| S | C2 | 2 | E2 no marcado | S | S5 | 6,00E-10 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-10 |
| S | C3 | 3 | E2 no marcado | S | S5 | 6,00E-10 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-10 |
| S | C4 | 1 | E2 no marcado | S | S6 | 2,00E-10 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| S | C5 | 2 | E2 no marcado | S | S6 | 2,00E-10 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| S | C6 | 3 | E2 no marcado | S | S6 | 2,00E-10 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| S | C7 | 1 | E2 no marcado | S | S7 | 2,00E-11 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-11 |
| S | C8 | 2 | E2 no marcado | S | S7 | 2,00E-11 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-11 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | C9 | 3 | E2 no marcado | S | S7 | 2,00E-11 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-11 |
| S | C10 | 1 | Blanco | Blanco | B1 | — | — | 160 | — | — | 160 | — |
| S | C11 | 2 | Blanco | Blanco | B2 | — | — | 160 | — | — | 160 | — |
| S | C12 | 3 | Blanco | Blanco | B3 | — | — | 160 | — | — | 160 | — |
| S | D1 | 1 | Noretinodrel | NE | WP1 | 6,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-05 |
| S | D2 | 1 | Noretinodrel | NE | WP1 | 6,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-05 |
| S | D3 | 1 | Noretinodrel | NE | WP1 | 6,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-05 |
| S | D4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP2 | 2,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| S | D5 | 1 | Noretinodrel | NE | WP2 | 2,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| S | D6 | 1 | Noretinodrel | NE | WP2 | 2,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| S | D7 | 1 | Noretinodrel | NE | WP3 | 6,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-06 |
| S | D8 | 1 | Noretinodrel | NE | WP3 | 6,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-06 |
| S | D9 | 1 | Noretinodrel | NE | WP3 | 6,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-06 |
| S | D10 | 1 | Noretinodrel | NE | WP4 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | D11 | 1 | Noretinodrel | NE | WP4 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | D12 | 1 | Noretinodrel | NE | WP4 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | E1 | 1 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-07 | 40 | | 40 | 80 | 160 | 3,0E-07 |
| S | E2 | 2 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-07 | 40 | | 40 | 80 | 160 | 3,0E-07 |
| S | E3 | 3 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-07 | 40 | | 40 | 80 | 160 | 3,0E-07 |
| S | E4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP | 2,00E-07 | 40 | | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| S | E5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP | 2,00E-07 | 40 | | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| S | E6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP | 2,00E-07 | 40 | | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| S | E7 | 1 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-08 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | E8 | 2 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-08 |
| S | E9 | 3 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-08 |
| S | E10 | 1 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-09 |
| S | E11 | 2 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-09 |
| S | E12 | 3 | Noretinodrel | NE | WP | 6,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-09 |
| S | F1 | 1 | OTES | N | OTES | 2,00E-03 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| S | F2 | 2 | OTES | N | OTES | 2,00E-03 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| S | F3 | 3 | OTES | N | OTES | 2,00E-03 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| S | F4 | 1 | OTES | N | OTES | 2,00E-04 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| S | F5 | 2 | OTES | N | OTES | 2,00E-04 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| S | F6 | 3 | OTES | N | OTES | 2,00E-04 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| S | F7 | 1 | OTES | N | OTES | 2,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-05 |
| S | F8 | 2 | OTES | N | OTES | 2,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-05 |
| S | F9 | 3 | OTES | N | OTES | 2,00E-05 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-05 |
| S | F10 | 1 | OTES | N | OTES | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | F11 | 2 | OTES | N | OTES | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | F12 | 3 | OTES | N | OTES | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| S | G1 | 1 | OTES | N | OTES | 2,00E-07 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-07 |
| S | G2 | 2 | OTES | N | OTES | 2,00E-07 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-07 |
| S | G3 | 3 | OTES | N | OTES | 2,00E-07 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 3,0E-07 |
| S | G4 | 1 | OTES | N | OTES | 2,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| S | G5 | 2 | OTES | N | OTES | 2,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | G6 | 3 | OTES | N | OTES | 2,00E-08 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| S | G7 | 1 | OTES | N | OTES | 2,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| S | G8 | 2 | OTES | N | OTES | 2,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| S | G9 | 3 | OTES | N | OTES | 2,00E-09 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| S | G10 | 1 | OTES | N | OTES | 2,00E-10 | 40 | — | 40 | — | 160 | 1,0E-10 |
| S | G11 | 2 | OTES | N | OTES | 2,00E-10 | 40 | — | 40 | — | 160 | 1,0E-10 |
| S | G12 | 3 | OTES | N | OTES | 2,00E-10 | 40 | — | 40 | — | 160 | 1,0E-10 |
| S | H1 | 1 | Marcado | H | H | — | — | — | 40 | — | 40 | — |
| S | H2 | 1 | Marcado | H | H | — | — | — | 40 | — | 40 | — |
| S | H3 | 1 | Marcado | H | H | — | — | — | 40 | — | 40 | — |
| S | H4 | 1 | Marcado | H | H | — | — | — | 40 | — | 40 | — |
| S | H5 | 1 | Marcado | H | H | — | — | — | 40 | — | 40 | — |
| S | H6 | 1 | Marcado | H | H | — | — | — | 40 | — | 40 | — |
| S | H7 | 1 | Testi sol. amortig. | BC | BC | — | 40 | 80 | 40 | — | 160 | — |
| S | H8 | 1 | Testi sol. amortig | BC | BC | — | 40 | 80 | 40 | — | 160 | — |
| S | H9 | 1 | Testi sol. amortig | BC | BC | — | 40 | 80 | 40 | — | 160 | — |
| S | H10 | 1 | Testi sol. amortig | BC | BC | — | 40 | 80 | 40 | — | 160 | — |
| S | H11 | 1 | Testi sol. amortig | BC | BC | — | 40 | 80 | 40 | — | 160 | — |
| S | H12 | 1 | Testi sol. amortig | BC | BC | — | 40 | 80 | 40 | — | 160 | — |

Obsérvese que los pocillos «marcados» están vacíos durante la incubación. Los 40 µl se añaden solo para el recuento de centelleo.

▼M8

**Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µl) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | A1 | 1 | Unión total | TB | TBB1B1 | — | 40 | — | 40 | 80 | 160 | — |
| P1 | A2 | 2 | Unión total | TB | TB2 | — | 40 | — | 40 | 80 | 160 | — |
| P1 | A3 | 3 | Unión total | TB | TB3 | — | 40 | — | 40 | 80 | 160 | — |
| P1 | A4 | 1 | Unión total | TB | TB4 | — | 40 | — | 40 | 80 | 160 | — |
| P1 | A5 | 2 | Unión total | TB | TB5 | — | 40 | — | 40 | 80 | 160 | — |
| P1 | A6 | 3 | Unión total | TB | TB6 | — | 40 | — | 40 | 80 | 160 | — |
| P1 | A7 | 1 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | A8 | 2 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | A9 | 3 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | A10 | 1 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | A11 | 2 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | A12 | 3 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S0 | 2,00E-06 | 40 | — | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | B1 | 1 | Producto problema 1 | TC1 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | B2 | 2 | Producto problema 1 | TC1 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | B3 | 3 | Producto problema 1 | TC1 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | B4 | 1 | Producto problema 1 | TC1 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | B5 | 2 | Producto problema 1 | TC1 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | B6 | 3 | Producto problema 1 | TC1 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | B7 | 1 | Producto problema 1 | TC1 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | B8 | 2 | Producto problema 1 | TC1 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | B9 | 3 | Producto problema 1 | TC1 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | B10 | 1 | Producto problema 1 | TC1 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | B11 | 2 | Producto problema 1 | TC1 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | B12 | 3 | Producto problema 1 | TC1 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |

▼M8

**Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µl) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | C1 | 1 | Producto problema 1 | TC1 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | C2 | 2 | Producto problema 1 | TC1 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | C3 | 3 | Producto problema 1 | TC1 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | C4 | 1 | Producto problema 1 | TC1 | 6 | 2,00E-08 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | C5 | 2 | Producto problema 1 | TC1 | 6 | 2,00E-08 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | C6 | 3 | Producto problema 1 | TC1 | 6 | 2,00E-08 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | C7 | 1 | Producto problema 1 | TC1 | 7 | 2,00E-09 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | C8 | 2 | Producto problema 1 | TC1 | 7 | 2,00E-09 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | C9 | 3 | Producto problema 1 | TC1 | 7 | 2,00E-09 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | C10 | 1 | Producto problema 1 | TC1 | 8 | 2,00E-10 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | C11 | 2 | Producto problema 1 | TC1 | 8 | 2,00E-10 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | C12 | 3 | Producto problema 1 | TC1 | 8 | 2,00E-10 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | D1 | 1 | Producto problema 2 | TC2 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | D2 | 2 | Producto problema 2 | TC2 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | D3 | 3 | Producto problema 2 | TC2 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | D4 | 1 | Producto problema 2 | TC2 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | D5 | 2 | Producto problema 2 | TC2 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | D6 | 3 | Producto problema 2 | TC2 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | D7 | 1 | Producto problema 2 | TC2 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | D8 | 2 | Producto problema 2 | TC2 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | D9 | 3 | Producto problema 2 | TC2 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | D10 | 1 | Producto problema 2 | TC2 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | D11 | 2 | Producto problema 2 | TC2 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | D12 | 3 | Producto problema 2 | TC2 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |

▼M8

**Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µl) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | E1 | 1 | Producto problema 2 | TC2 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | E2 | 2 | Producto problema 2 | TC2 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | E3 | 3 | Producto problema 2 | TC2 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | E4 | 1 | Producto problema 2 | TC2 | 6 | — | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | E5 | 2 | Producto problema 2 | TC2 | 6 | — | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | E6 | 3 | Producto problema 2 | TC2 | 6 | — | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | E7 | 1 | Producto problema 2 | TC2 | 7 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | E8 | 2 | Producto problema 2 | TC2 | 7 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | E9 | 3 | Producto problema 2 | TC2 | 7 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | E10 | 1 | Producto problema 2 | TC2 | 8 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | E11 | 2 | Producto problema 2 | TC2 | 8 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | E12 | 3 | Producto problema 2 | TC2 | 8 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | F1 | 1 | Producto problema 3 | TC3 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | F2 | 2 | Producto problema 3 | TC3 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | F3 | 3 | Producto problema 3 | TC3 | 1 | 2,00E-03 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-03 |
| P1 | F4 | 1 | Producto problema 3 | TC3 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | F5 | 2 | Producto problema 3 | TC3 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | F6 | 3 | Producto problema 3 | TC3 | 2 | 2,00E-04 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-04 |
| P1 | F7 | 1 | Producto problema 3 | TC3 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | F8 | 2 | Producto problema 3 | TC3 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | F9 | 3 | Producto problema 3 | TC3 | 3 | 2,00E-05 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-05 |
| P1 | F10 | 1 | Producto problema 3 | TC3 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | F11 | 2 | Producto problema 3 | TC3 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |
| P1 | F12 | 3 | Producto problema 3 | TC3 | 4 | 2,00E-06 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-06 |

▼M8

**Distribución de los pocillos para el ensayo de unión de competencia**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µl) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | G1 | 1 | Producto problema 3 | TC3 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | G2 | 2 | Producto problema 3 | TC3 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | G3 | 3 | Producto problema 3 | TC3 | 5 | 2,00E-07 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-07 |
| P1 | G4 | 1 | Producto problema 3 | TC3 | 6 | 2,00E-08 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | G5 | 2 | Producto problema 3 | TC3 | 6 | 2,00E-08 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | G6 | 3 | Producto problema 3 | TC3 | 6 | 2,00E-08 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-08 |
| P1 | G7 | 1 | Producto problema 3 | TC3 | 7 | 2,00E-09 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | G8 | 2 | Producto problema 3 | TC3 | 7 | 2,00E-09 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | G9 | 3 | Producto problema 3 | TC3 | 7 | 2,00E-09 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-09 |
| P1 | G10 | 1 | Producto problema 3 | TC3 | 8 | 2,00E-10 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | G11 | 2 | Producto problema 3 | TC3 | 8 | 2,00E-10 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | G12 | 3 | Producto problema 3 | TC3 | 8 | 2,00E-10 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | 1,0E-10 |
| P1 | H1 | 1 | Noretinodrel | NE | | IC50 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H2 | 2 | Noretinodrel | NE | | IC50 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H3 | 3 | Noretinodrel | NE | | IC50 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H4 | 1 | Noretinodrel | NE | | 1,00E-4,5 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H5 | 2 | Noretinodrel | NE | | 1,00E-4,5 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H6 | 3 | Noretinodrel | NE | | 1,00E-4,5 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H7 | 1 | E2 no marcado S | | | IC50 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H8 | 2 | E2 no marcado S | | | IC50 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H9 | 3 | E2 no marcado S | | | IC50 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H10 | 1 | E2 no marcado S | | | 1,00E-7 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H11 | 2 | E2 no marcado S | | | 1,00E-7 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |
| P1 | H12 | 3 | E2 no marcado S | | | 1,00E-7 | 40 | 0 | 40 | 80 | 160 | |

▼**M8**

*Apéndice 3*

ENSAYO *IN VITRO* DEL INSTITUTO DE EVALUACIÓN E INVESTIGACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS (CERI) DE UNIÓN AL RECEPTOR ESTROGÉNICO CON UTILIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA CON UN DOMINIO DE UNIÓN AL LIGANDO DEL ERA RECOMBINANTE HUMANO

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

1. Este ensayo de unión al receptor estrogénico (ERα) de saturación y de competencia *in vitro* utiliza un dominio de unión al ligando (*ligand binding domain*, LBD) del receptor ERα humano (hrERα). Esta construcción proteínica fue producida por el Instituto de Evaluación e Investigación de Productos Químicos de Japón (Chemicals Evaluation Research Institute, CERI), existe como proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) y se expresa en *E. coli*. El protocolo del CERI fue sometido a un estudio de validación internacional multilaboratorios (2), que demostró su pertinencia y fiabilidad para la finalidad prevista del ensayo.

2. Este ensayo es un procedimiento de cribado para identificar sustancias que pueden unirse al hrERα. Se utiliza para determinar la capacidad de un producto problema de competir con el 17β-estradiol para unirse al LBD del hrERα. Los resultados cuantitativos del ensayo pueden incluir la $CI_{50}$ (medida de la concentración del producto problema necesaria para desplazar la mitad del [$^3$H]17β-estradiol del hrERα) y las afinidades relativas de unión de los productos problema respecto al hrERα en comparación con el 17β-estradiol. A efectos de cribado de los productos problema, entre los resultados cualitativos aceptables de los ensayos pueden incluirse la clasificación de los productos problema como ligandos o no ligandos del hrERα, o bien si el resultado es dudoso sobre la base de los criterios descritos para las curvas de unión.

3. El ensayo utiliza un ligando radiactivo, lo que impone al laboratorio la obligación de disponer de una licencia de materiales radiactivos. Todos los procedimientos con radioisótopos y productos peligrosos deben ajustarse a las normas y procedimientos descritos en la legislación nacional.

4. Las secciones «**INTRODUCCIÓN GENERAL** » y «**COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER** » deben leerse antes de utilizar este ensayo con fines normativos. Las definiciones y abreviaturas utilizadas en las presentes directrices de ensayo se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO (VÉASE TAMBIÉN LA INTRODUCCIÓN GENERAL)

5. El ensayo de unión al hrERα mide la capacidad de un ligando radiomarcado ([$^3$H]17β-estradiol) para unirse al receptor estrogénico en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema (es decir, un competidor). Los productos problema que presentan una elevada afinidad por el receptor estrogénico compiten con el ligando radiomarcado a una concentración menor en comparación con los productos que presentan menor afinidad por el receptor.

6. Este ensayo consta de dos componentes principales: un experimento de unión de saturación para caracterizar los parámetros de la interacción receptor-ligando, seguido de un experimento de unión de competencia que caracteriza la competencia entre un producto problema y un ligando radiomarcado para unirse al ER.

▼M8

7. El objetivo del experimento de unión de saturación es caracterizar un determinado lote de receptores en cuanto a su afinidad de unión y número para preparar el experimento de unión de competencia. El experimento de unión de saturación mide, en condiciones de equilibrio, la afinidad de una concentración fija del receptor estrogénico por su ligando natural (representada por la constante de disociación, Kd) y la concentración de puntos activos de unión de los receptores (Bmax).

8. El experimento de unión de competencia mide la afinidad de una sustancia para competir con el [$^3$H]17β-estradiol en cuanto a la unión al ER. La afinidad se cuantifica por la concentración del producto problema que, en equilibrio, inhibe el 50 % de la unión específica del [$^3$H]17β-estradiol (denominada "concentración inhibitoria del 50 %" o $CI_{50}$). También puede evaluarse utilizando la afinidad relativa de unión (RBA, en relación con la $CI_{50}$ del estradiol medida aparte en la misma tanda). El experimento de unión de competencia mide la unión del [$^3$H]17β-estradiol a una concentración fija en presencia de una amplia gama de concentraciones (ocho órdenes de magnitud) del producto problema. A continuación, se ajustan los datos, en la medida de lo posible, a una forma de la ecuación de Hill (Hill, 1910) que describe el desplazamiento del radioligando por un ligando competitivo de un solo punto de unión. La magnitud del desplazamiento del estradiol radiomarcado en equilibrio se utiliza para caracterizar el producto problema como ligando, no ligando, o generador de una respuesta dudosa.

PROCEDIMIENTO

**Demostración del comportamiento aceptable de la proteína del hrERα**

9. Con anterioridad a la realización sistemática de los ensayos de unión de saturación y de competencia, se debe demostrar que cada nuevo lote de hrERα presenta un comportamiento correcto en el laboratorio en el que se va a utilizar. Para demostrar el comportamiento debe seguirse un proceso de dos fases. Se trata de las siguientes:

— Realizar un ensayo de unión de [$^3$H]17β-estradiol de saturación para demostrar la especificidad y saturación del hrERα. El análisis no lineal de regresión de estos datos (por ejemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) y la consiguiente gráfica de Scatchard deben documentar la afinidad de unión al hrERα del [$^3$H]17β-estradiol (Kd) y el número de receptores (Bmax) respecto a cada lote del hrERα.

— Llevar a cabo un ensayo de unión de competencia utilizando las sustancias testigo [estrógeno de referencia (17β-estradiol)], un ligando débil (por ejemplo, noretinodrel o noretindrona), y un no ligando (octiltrietoxisilano, OTES). Cada laboratorio debe establecer una base de datos históricos para documentar la coherencia de la $CI_{50}$ y de los valores pertinentes sobre el estrógeno de referencia y el ligando débil entre experimentos y diferentes lotes de hrERα. Además, los parámetros de las curvas de unión de competencia de las sustancias testigo deben estar dentro de los límites del intervalo de confianza del 95 % (véase el cuadro 1) que se han establecido utilizando datos de los laboratorios que participaron en el estudio de validación de este ensayo (2).

*Cuadro 1*

**Criterios de comportamiento establecidos para el estrógeno de referencia y el ligando débil, ensayo del CERI de unión al hrER.**

| Sustancia | Parámetro | Media [a] | Desviación típica (n) | Intervalos de confianza del 95 % [b] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| **17β-Estradiol** | Parte superior | 104,74 | 13,12 (70) | 101,6 | 107,9 |
| | Parte inferior | 0,85 | 2,41 (70) | 0,28 | 1,43 |

▼M8

| Sustancia | Parámetro | Media [a] | Desviación típica (n) | Intervalos de confianza del 95 % [b] | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Límite inferior | Límite superior |
| | Pendiente de Hill | –1,22 | 0,20 (70) | –1,27 | –1,17 |
| | Log $CI_{50}$ | –8,93 | 0,23 (70) | –8,98 | –8,87 |
| **Noretinodrel** | Parte superior | 101,31 | 10,55 (68) | 98,76 | 103,90 |
| | Parte inferior | 2,39 | 5,01 (68) | 1,18 | 3,60 |
| | Pendiente de Hill | –1,04 | 0,21 (68) | –1,09 | –0,99 |
| | Log $CI_{50}$ | –6,19 | 0,40 (68) | –6,29 | –6,10 |
| **Noretindrona [c]** | Parte superior | 92,27 | 7,79 (23) | 88,90 | 95,63 |
| | Parte inferior | 16,52 | 10,59 (23) | 11,94 | 21,10 |
| | Pendiente de Hill | –1,18 | 0,32 (23) | –1,31 | –1,04 |
| | Log $CI_{50}$ | –6,01 | 0,54 (23) | –6,25 | –5,78 |

[a] Los valores de la media ± desviación típica (DT) con tamaño de la muestra n se calcularon utilizando estimaciones del ajuste de la curva (ecuación de Hill de 4 parámetros) con tandas de testigos realizadas en cuatro laboratorios durante el estudio de validación (véase el anexo N de la referencia 2).

[b] Los intervalos de confianza del 95 % se proporcionan como guía para los criterios de aceptabilidad.

[c] El ensayo de noretindrona era opcional para la subtarea 4 durante el estudio de validación (en la referencia 2, véase la subtarea 4). Así pues, los valores de la media ± DT (n) se calcularon utilizando estimaciones de ajuste de la curva (ecuación de Hill de 4 parámetros) en relación con tandas de control realizadas en dos laboratorios.
El intervalo de la $CI_{50}$ dependerá de la Kd del preparado del receptor y de la concentración de ligando radiomarcado utilizada en cada laboratorio. Será aceptable un ajuste adecuado del intervalo de la $CI_{50}$ sobre la base de las condiciones utilizadas para realizar el ensayo.

**Demostración del comportamiento del laboratorio**

10. Véanse los puntos 17 y 18 y el cuadro 2 en la sección «**COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER** » de este método de ensayo. Cada ensayo (unión de saturación y de competencia) debe consistir en tres tandas independientes (es decir, con diluciones nuevas del receptor, de los productos y de los reactivos) en días diferentes, y cada tanda debe contener tres réplicas.

**Determinación de la concentración del receptor (hrERα)**

11. La concentración del receptor activo varía ligeramente en función del lote y de las condiciones de conservación. Por este motivo, debe determinarse la concentración del receptor activo tal como se recibe del proveedor. Esto dará la concentración adecuada del receptor activo en el momento de la tanda.

12. En condiciones correspondientes a la unión de competencia (es decir, [$^3$H]-estradiol 0,5 nM), deben incubarse concentraciones nominales del receptor de 0,1, 0,2, 0,4 y 0,6 nM en ausencia (unión total) y presencia (unión inespecífica) de estradiol no marcado 1 μM. La unión específica, calculada

▼M8

como la diferencia de unión total e inespecífica, se representa frente a la concentración nominal del receptor. La concentración del receptor que da valores de unión específica correspondientes al 40 % de la sustancia radiomarcada añadida está relacionada con la correspondiente concentración del receptor, y esta concentración del receptor debe utilizarse para los experimentos de unión de saturación y de competencia. Con frecuencia, una concentración final del rhER de 0,2 nM cumplirá esta condición.

13. Si el criterio del 40 % no puede cumplirse de forma reiterada, deberá comprobarse si no se encuentran posibles errores en la configuración experimental. Si no se cumple el criterio del 40 %, puede deberse a que en el lote del recombinante hay muy poco de receptor activo, y en tal caso debe considerarse el uso de otro lote del receptor.

**Ensayo de saturación**

14. Deben evaluarse por triplicado ocho concentraciones cada vez mayores de [$^3$H]17β-estradiol, en las tres condiciones siguientes (véase el cuadro 2):

a. En ausencia de 17β-estradiol no marcado y presencia de ER. Se trata de la determinación de la unión total por medida de la radiactividad en los pocillos que solo tienen [$^3$H]17β-estradiol.

b. En presencia de una concentración de 17-β-estradiol no marcado que supera 2000 veces la concentración de 17β-estradiol marcado y en presencia del ER. El propósito de esta condición es saturar los puntos activos de unión con 17β-estradiol no marcado y, midiendo la radiactividad en los pocillos, determinar la unión inespecífica. Se considera que el eventual estradiol marcado restante que pueda unirse al receptor se une a un punto de unión inespecífica, ya que el estradiol no marcado debe estar a una concentración tan elevada que está unido a todos los puntos específicos disponibles del receptor.

c. En ausencia de 17β-estradiol no marcado y ausencia de ER (determinación de la radiactividad total).

*Preparación de las soluciones de [$^3$H]17β-estradiol, de 17β-estradiol no marcado y de hrERα*

15. Debe prepararse una solución 40 nM de [$^3$H]-17β-estradiol a partir de una solución madre 1 μM de [$^3$H]17β-estradiol en DMSO, mediante la adición de DMSO (para preparar una solución 200 nM) y de solución amortiguadora de ensayo a temperatura ambiente (para preparar la solución 40 nM). Utilizando esta solución 40 nM, se prepara la serie de diluciones de [$^3$H]17β-estradiol, con concentraciones que van desde 0,313 nM hasta 40 nM con solución amortiguadora de ensayo a temperatura ambiente (representada en la columna 12 del cuadro 2). Las concentraciones finales del ensayo, que van de 0,0313 a 4,0 nM, se obtendrán añadiendo 10 μl de estas soluciones a los pocillos de ensayo respectivos de una placa de microvaloración de 96 pocillos (véanse los cuadros 2 y 3). La preparación de la solución amortiguadora de ensayo, el cálculo de la solución madre original de [$^3$H]17β-estradiol sobre la base de su actividad específica, la preparación de las diluciones y la determinación de las concentraciones se describen con detalle en el protocolo del CERI (2).

16. Las diluciones de las soluciones de 17β-estradiol no marcado deben prepararse a partir de una solución madre 1 nM de 17β-estradiol añadiendo solución amortiguadora de ensayo para conseguir ocho concentraciones cada vez mayores que inicialmente van de 0,625 μM a 80 μM. Las concentraciones finales del ensayo, que van de 0,0625 a 8 μM, se obtendrán añadiendo 10 μl de estas soluciones a los pocillos de ensayo respectivos destinados a la medición de la unión inespecífica en una placa de microvaloración de 96 pocillos (véanse los cuadros 2 y 3). La preparación de diluciones de 17β-estradiol no marcado se describe con detalle en el protocolo del CERI (2).

▼**M8**

17. Debe utilizarse la concentración del receptor que da una unión específica del 40 ± 10 % (véanse los puntos 12-13). La solución de hrERα debe prepararse con solución amortiguadora enfriada con hielo, justo antes de su utilización, es decir, después de que se hayan preparado todos los pocillos relacionados con la unión total, la unión inespecífica y el ligando marcado solo.

18. Las placas de microvaloración de 96 pocillos se preparan como se ilustra en el cuadro 2, con 3 réplicas por concentración de [$^3$H]17β-estradiol. En el cuadro 3 se indica la asignación de los volúmenes de [$^3$H]17β-estradiol, de 17β-estradiol no marcado, de solución amortiguadora y de receptor.

*Cuadro 2*

**Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de saturación**

| | 1 (*) | 2 (*) | 3 (*) | 4 (*) | 5 (*) | 6 (*) | 7 (*) | 8 (*) | 9 (*) | 10 | 11 (**) | 12 (**) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Para la medición de la TB | | | Para la medición de la NSB | | | Para la determinación del ligando marcado solo | | | | Diluciones de E2 no marcado en las columnas 4-6 de la placa | Diluciones de [$^3$H]E2 en las columnas 1-9 de la placa |
| *A* | [$^3$H]E2 0,0313 nM+ ER | | | [$^3$H]E2 0,0313 nM+ E2 0,0625 μM+ ER | | | 0,0313 nM | | | | 0,625 μM | 0,313 nM |
| *B* | [$^3$H]E2 0,0625 nM+ ER | | | [$^3$H]E2 0,0625 nM+ E2 0,125 μM+ ER | | | 0,0625 nM | | | | 1,25 μM | 0,625 nM |
| *C* | [$^3$H]E2 0,125 nM+ ER | | | [$^3$H]E2 0,125 nM+ E2 0,25 μM+ ER | | | 0,125 nM | | | | 2,5 μM | 1,25 nM |
| ***D*** | [$^3$H]E2 0,250 nM+ ER | | | [$^3$H]E2 0,250 nM+ E2 0,5 μM+ ER | | | 0,250 nM | | | | 5 μM | 2,5 nM |
| *E* | [$^3$H]E2 0,50 nM+ ER | | | [$^3$H]E2 0,50 nM+ E2 1 μM+ ER | | | 0,50 nM | | | | 10 μM | 5 nM |
| *F* | [$^3$H]E2 1,00 nM+ ER | | | [$^3$H]E2 1,00 nM+ E2 2 μM+ ER | | | 1,00 nM | | | | 20 μM | 10 nM |
| *G* | [$^3$H]E2 2,00 nM+ ER | | | [$^3$H]E2 2,00 nM+ E2 4 μM+ ER | | | 2,00 nM | | | | 40 μM | 20 nM |
| *H* | [$^3$H]E2 4,00 nM+ ER | | | [$^3$H]E2 4,00 nM+ E2 8 μM+ ER | | | 4,00 nM | | | | 80 μM | 40 nM |

TB: unión total.
NSB: unión inespecífica.
[$^3$H]E2: [$^3$H]17β-estradiol.
E2: 17β-estradiol no marcado.
(*) Las concentraciones aquí indicadas son las concentraciones finales de cada pocillo.
(**) Las diluciones de E2 no marcado y de [$^3$H]E2 pueden prepararse en una placa diferente.

▼**M8**

*Cuadro 3*

**Volúmenes de reactivo para la placa de microvaloración de saturación**

| Número de columna | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 (*) | 8 (*) | 9 (*) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Fases de la preparación | | Pocillos TB | | | Pocillos NSB | | | Ligando marcado solo | | |
| Volumen de los componentes de los pocillos de reacción indicados arriba y orden de adición | Solución amortiguadora | 60 µl | | | 50 µl | | | 90 µl | | |
| | E2 no marcado de la columna 11 del cuadro 2 | – | | | 10 µl | | | – | | |
| | [$^3$H]E2 de la columna 12 del cuadro 2 | 10 µl | | | 10 µl | | | 10 µl | | |
| | hrERα | 30 µl | | | 30 µl | | | – | | |
| Volumen total de reacción | | 100 µl | | | 100 µl | | | 100 µl | | |
| Incubación | | **TRAS 2 HORAS DE REACCIÓN EN LA INCUBACIÓN** | | | | | | Cuantificación de la radiactividad justo después de la preparación. Sin incubación. | | |
| Tratamiento con DCC al 0,4 % | | Sí | | | Sí | | | **No** | | |
| Volumen de DCC al 0,4 % | | 100 µl | | | 100 µl | | | – | | |
| Filtración | | Sí | | | Sí | | | No | | |
| MEDICIÓN DE LAS DPM | | | | | | | | | | |
| Volumen de cuantificación añadido a la mezcla de centelleo | | 100 µl (**) | | | 100 µl (**) | | | 50 µl | | |

(*) Si se utiliza el LSC para microplacas a fin de medir las dpm, no es adecuado preparar el ligando marcado solo en la misma placa de ensayo que tiene pocillos TB y NSB. El ligando marcado solo debe prepararse en una placa diferente.

(**) Si se utiliza la centrifugación para separar el DCC, los 50 µl de sobrenadante deben medirse por LSC para evitar la contamination del DCC.

19. Las placas de microvaloración del ensayo para la determinación de la unión total y de la unión inespecífica deben incubarse a temperatura ambiente (de 22º C a 28 ºC) durante dos horas.

*Medición del [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα*

20. Tras el período de incubación de dos horas, el [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα debe separarse del [$^3$H]-17β-estradiol libre añadiendo a los pocillos 100 µl de suspensión de DCC al 0,4 % enfriada con hielo. A continuación, las placas deben colocarse en hielo durante 10 minutos y la mezcla de reacción y la suspensión de DCC se deben filtrar mediante transferencia a un filtro de placas de microvaloración para retirar el DCC. A continuación, deben añadirse 100 µl del filtrado al líquido de centelleo en frascos LSC para determinar el número de desintegraciones por minuto (dpm) por frasco mediante recuento de centelleo líquido.

▼M8

21. Como alternativa, si no se dispone de filtro de microplacas, puede conseguirse la eliminación del DCC mediante centrifugación. A continuación, se deben tomar 50 µl del sobrenadante que contiene el [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα con muchísimo cuidado para evitar cualquier contaminación de los pocillos por contacto con la suspensión de DCC, y deben utilizarse para el recuento de centelleo.

22. El ligando marcado solo se utiliza para determinar las desintegraciones por minuto (dpm) del [$^3$H]17β-estradiol añadido a los pocillos de ensayo. La radiactividad debe cuantificarse justo después de la preparación. Estos pocillos no deben incubarse y no deben tratarse con suspensión de DCC, sino que su contenido debe añadirse directamente al líquido de centelleo. Estas medidas muestran cuánto [$^3$H]17β-estradiol medido en dpm se había añadido a cada conjunto de pocillos en relación con la unión total y con la unión inespecífica.

**Ensayo de unión de competencia**

23. El ensayo de unión de competencia mide la unión de una única concentración de [$^3$H]17β-estradiol en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema. Deben utilizarse en paralelo tres réplicas de cada concentración en cada tanda. Además, deben realizarse tres tandas no simultáneas con cada producto problema. El ensayo debe configurarse en una o más placas de microvaloración con 96 pocillos.

*Testigos*

24. Al realizar el ensayo, deben incluirse en cada experimento testigos y disolventes en paralelo (es decir, estrógeno de referencia, ligando débil y no ligando). Deben incluirse en una placa de cada tanda todos los puntos que forman las curvas de concentración completas del estrógeno de referencia y de los testigos (es decir, ligando débil y no ligando). Todas las demás placas deben contener: i) una concentración elevada (desplazamiento máximo, es decir, aproximadamente el desplazamiento completo del ligando radiomarcado) y una media (aproximadamente la $CI_{50}$) tanto de E2 como del ligando débil, por triplicado; 2) el testigo de disolvente y la unión inespecífica, cada uno por triplicado. En el protocolo del CERI se describen con detalle los procedimientos para la preparación de la solución amortiguadora y de las soluciones de [$^3$H]17β-estradiol, de hrERα y de producto problema (2).

*Control del disolvente:*

25. El control del disolvente indica que este no interactúa con el sistema de ensayo y que también mide la unión total (TB). El DMSO es el disolvente preferido. Si la concentración más alta del producto problema no es soluble en DMSO, también se podrá utilizar etanol. La concentración de DMSO en los pocillos finales del ensayo debe ser del 2,05 % y podría aumentarse hasta el 2,5 % en caso de falta de solubilidad del producto problema. No deben utilizarse concentraciones de DMSO por encima del 2,5 % debido a la interferencia de las concentraciones más elevadas de disolvente con el ensayo. En el caso de productos problema que no sean solubles en DMSO pero que sí sean solubles en etanol, podrá utilizarse sin interferencias en el ensayo un máximo de etanol del 2 %.

*Testigo de la solución amortiguadora:*

26. El testigo de la solución amortiguadora (*buffer control*, BC) no debe contener ni disolvente ni producto problema, pero sí todos los demás componentes del ensayo. Los resultados del testigo de la solución amortiguadora se comparan con el testigo de disolvente para verificar que el disolvente utilizado no afecta al sistema de ensayo.

▼**M8**

*Ligando fuerte (estrógeno de referencia)*

27. El 17β-estradiol (n.º CAS 50-28-2) es el ligando endógeno y se une con gran afinidad al ER, subtipo alfa. Debe prepararse una curva patrón con 17β-estradiol no marcado para cada uno de los ensayos de unión de competencia al hrERα, para permitir una evaluación de la variabilidad cuando se realice el ensayo a lo largo del tiempo dentro del mismo laboratorio. Deben prepararse ocho soluciones de 17β-estradiol no marcado en DMSO y en solución amortiguadora de ensayo, y las concentraciones finales en los pocillos de ensayo que se vayan a utilizar para la curva patrón deben espaciarse como se indica a continuación: $10^{-6}$, $10^{-7}$, $10^{-8}$, $10^{-8,5}$, $10^{-9}$, $10^{-9,5}$, $10^{-10}$, $10^{-11}$ M. La concentración más elevada de 17β-estradiol no marcado (1 μM) debe servir de indicador de unión inespecífica (*non-specific binding*, NSB). Esta concentración se distingue con el rótulo "NSB" en el cuadro 4, aunque también forma parte de la curva patrón.

*Ligando débil*

28. Debe incluirse un ligando débil [noretinodrel (n.º CAS 68-23-5) o, como alternativa, noretindrona (n.º CAS 68-22-4)] para demostrar la sensibilidad de cada experimento y permitir una evaluación de la variabilidad cuando se realice el ensayo a lo largo del tiempo. Deben prepararse ocho soluciones de ligando débil en DMSO y en solución amortiguadora de ensayo, y las concentraciones finales en los pocillos de ensayo deben espaciarse como se indica a continuación: $10^{-4,5}$, $10^{-5,5}$, $10^{-6}$, $10^{-6,5}$, $10^{-7}$, $10^{-7,5}$, $10^{-8}$ y $10^{-9}$ M.

*No ligando*

29. Debe utilizarse como testigo negativo (no ligando) el octiltrietoxisilano (OTES, n.º CAS 2943-75-1). Aporta la garantía de que el ensayo, tal como se realiza, detecta los productos problema que no se unen al hrERα. Deben prepararse ocho soluciones de no ligando en DMSO y en solución amortiguadora de ensayo, y las concentraciones finales en los pocillos de ensayo deben espaciarse como se indica a continuación: $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$, $10^{-7}$, $10^{-8}$, $10^{-9}$, $10^{-10}$ M. Puede utilizarse como no ligando alternativo el ftalato de di-n-butilo (DBP, n.º CAS 84-72-2), pero solo hasta la concentración de $10^{-4}$ M. Se ha demostrado que la solubilidad máxima del DBP en el ensayo es de $10^{-4}$ M.

*Concentración del hrERα*

30. Debe utilizarse la cantidad del receptor que da una unión específica del 40 ± 10 % (véanse los puntos 12-13 del apéndice 3). La solución de hrERα debe prepararse mediante dilución de hrERα funcional en solución amortiguadora enfriada con hielo, justo antes de su utilización.

*[$^3$H]17β-estradiol*

31. La concentración final de [$^3$H]17β-estradiol en los pocillos de ensayo debe ser de 0,5 nM.

*Productos problema*

32. En primer lugar, es necesario realizar un ensayo de solubilidad para determinar el límite de solubilidad de cada producto problema y para identificar el intervalo adecuado de concentraciones que se ha de utilizar al aplicar el protocolo del ensayo. El límite de solubilidad de cada producto problema se determina inicialmente en el disolvente y después se confirma en las condiciones del ensayo. La concentración final utilizada en el ensayo no debe ser superior a 1 mM. La determinación del intervalo de concentraciones consiste en someter a ensayo un control del disolvente, junto con un mínimo de ocho diluciones logarítmicas en serie, a partir de la concentración máxima aceptable (por ejemplo, 1 mM o menos, según el límite de solubilidad), y anotar la presencia de turbidez o precipitado (véase también el punto 35 del apéndice 3). Una vez determinado el intervalo de concentraciones para los ensayos, debe someterse a ensayo el producto problema con 8 concentraciones logarítmicas espaciadas de forma adecuada, según los resultados de la

▼M8

determinación del intervalo de concentraciones. Las concentraciones sometidas a ensayo en los experimentos segundo y tercero deben ajustarse más según convenga para caracterizar mejor la curva concentración-respuesta, en caso necesario.

33. Las diluciones del producto problema deben prepararse en el disolvente adecuado (véase el punto 25 del apéndice 3). Si la concentración más elevada del producto problema no fuera soluble en DMSO o en etanol, y la adición de más disolvente hiciera que la concentración de disolvente en el tubo final fuera mayor que el límite aceptable, la concentración más elevada podría reducirse a la concentración inmediatamente inferior. En este caso, puede añadirse una concentración adicional en el extremo inferior de la serie de concentraciones. Las demás concentraciones de la serie deben permanecer inalteradas.

34. Las soluciones del producto problema deben ser objeto de un estrecho seguimiento cuando se añaden al pocillo del ensayo, ya que el producto problema puede provocar una precipitación cuando se añade al pocillo del ensayo. Los datos de todos los pocillos que contengan precipitado deben quedar excluidos del ajuste de la curva, y debe anotarse el motivo de la exclusión de los datos.

35. Si hay información previa de otras fuentes que proporcionen el log $CI_{50}$ de un producto problema, puede ser adecuado espaciar geométricamente las diluciones más cerca alrededor del log $CI_{50}$ previsto (es decir, 0,5 unidades logarítmicas). Los resultados finales deben reflejar la suficiente amplitud de las concentraciones a ambos lados del log $CI_{50}$ , incluidos la «parte superior» y la «parte inferior», de manera que la curva de unión pueda caracterizarse adecuadamente.

*Organización de las placas del ensayo*

36. Deben prepararse placas de microvaloración etiquetadas utilizando incubaciones séxtuples del control del disolvente, la concentración más elevada del estrógeno de referencia (E2), que también sirve de indicador de la unión inespecífica (NSB), el testigo de la solución amortiguadora, e incubaciones triplicadas de cada una de las ocho concentraciones del testigo no ligando (octiltrietoxisilano), las siete concentraciones inferiores del estrógeno de referencia (E2), las ocho concentraciones del ligando débil (noretinodrel o noretindrona) y las ocho concentraciones de cada producto problema (TC). En el cuadro 4 a continuación figura un ejemplo de diagrama de la disposición de la placa para las curvas de concentración completas correspondientes al estrógeno de referencia y al testigo. Se utilizan placas de microvaloración adicionales para el producto problema y deben incluir testigos de las placas, es decir, 1) una concentración elevada (desplazamiento máximo) y media (aproximadamente la $CI_{50}$) tanto del E2 como de un ligando débil, por triplicado; 2) el testigo de disolvente (como unión total) y un ligando inespecífico, cada uno por sextuplicado (cuadro 5). En el apéndice 3.3 se presenta un ejemplo de una hoja de cálculo de la configuración de la placa de microvaloración para el ensayo de competencia con tres productos problema desconocidos. Las concentraciones indicadas en la hoja de cálculo, así como en los cuadros 4 y 5, se refieren a las concentraciones finales utilizadas en cada pocillo de ensayo. La concentración máxima de E2 debe ser $1 \times 10^{-7}$ M y la del ligando débil debe ser la concentración más elevada utilizada para este en la placa 1. La concentración $CI_{50}$ debe ser determinada por el laboratorio a partir de su base de datos de testigos históricos. Se espera que este valor sea similar al observado en los estudios de validación (véase el cuadro 1).

▼**M8**

*Cuadro 4*

**Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de competencia** [1] [2]**, curvas completas de concentración del estrógeno de referencia y de los testigos (placa 1).**

| | *1* | *2* | *3* | *4* | *5* | *6* | *7* | *8* | *9* | *10* | *11* | *12* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Testigo de la solución amortiguadora y testigo positivo (E2) | | | Positivo débil (noretinodrel) | | | Testigo negativo (OTES) | | | TB y NSB | | |
| *A* | Blanco (*) | | | $1 \times 10^{-9}$ M | | | $1 \times 10^{-10}$ M | | | TB (control del disolvente) (DMSO al 2,05 %) | | |
| *B* | E2 ($1 \times 10^{-11}$ M) | | | $1 \times 10^{-8}$ M | | | $1 \times 10^{-9}$ M | | | | | |
| *C* | E2 ($1 \times 10^{-10}$ M) | | | $1 \times 10^{-7,5}$ M | | | $1 \times 10^{-8}$ M | | | NSB (E2 $10^{-6}$ M) | | |
| *D* | E2 ($1 \times 10^{-9,5}$ M) | | | $1 \times 10^{-7}$ M | | | $1 \times 10^{-7}$ M | | | | | |
| *E* | E2 ($1 \times 10^{-9}$ M) | | | $1 \times 10^{-6,5}$ M | | | $1 \times 10^{-6}$ M | | | Testigo de la solución amortiguadora | | |
| *F* | E2 ($1 \times 10^{-8,5}$ M) | | | $1 \times 10^{-6}$ M | | | $1 \times 10^{-5}$ M | | | | | |
| *G* | E2 ($1 \times 10^{-8}$ M) | | | $1 \times 10^{-5,5}$ M | | | $1 \times 10^{-4}$ M | | | Blanco (de marcado) (**) | | |
| *H* | E2 ($1 \times 10^{-7}$ M) | | | $1 \times 10^{-4,5}$ M | | | $1 \times 10^{-3}$ M | | | | | |

([1]) Muestra elaborada para la placa de microvaloración de los patrones que ha de someterse a ensayo con cada experimento.
([2]) Obsérvese que esta placa de microvaloración se forma con las diluciones hechas en la placa de dilución descrita para los patrones en las secciones anteriores.
En este ejemplo, el ligando débil es el noretinodrel (NE).
(*) Blanco real, pocillo no utilizado.
(**) Blanco, no utilizado durante la incubación, pero sí utilizado para confirmar la radiactividad total añadida.

*Cuadro 5*

**Disposición de las placas de microvaloración para el ensayo de unión de competencia, placas adicionales para los productos problema (TC) y los testigos de las placas.**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Producto problema-1 (TC-1) | | | Producto problema-2 (TC-2) | | | Producto problema-3 (TC-3) | | | Testigos | | |
| *A* | TC-1 ($1 \times 10^{-10}$ M) | | | TC-2 ($1 \times 10^{-10}$ M) | | | TC-3 ($1 \times 10^{-10}$ M) | | | E2 ($1 \times 10_{-7}$ M) | | |
| *B* | TC-1 ($1 \times 10^{-9}$ M) | | | TC-2 ($1 \times 10^{-9}$ M) | | | TC-3 ($1 \times 10^{-9}$ M) | | | E2 ($CI_{50}$) | | |
| *C* | TC-1 ($1 \times 10^{-8}$ M) | | | TC-2 ($1 \times 10^{-8}$ M) | | | TC-3 ($1 \times 10^{-8}$ M) | | | NE ($1 \times 10^{-4,5}$) | | |
| *D* | TC-1 ($1 \times 10^{-7}$ M) | | | TC-2 ($1 \times 10^{-7}$ M) | | | TC-3 ($1 \times 10^{-7}$ M) | | | NE ($CI_{50}$) | | |
| *E* | TC-1 ($1 \times 10^{-6}$ M) | | | TC-2 ($1 \times 10^{-6}$ M) | | | TC-3 ($1 \times 10^{-6}$ M) | | | NSB (E2 $10^{-6}$ M) | | |
| *F* | TC-1 ($1 \times 10^{-5}$ M) | | | TC-2 ($1 \times 10^{-5}$ M) | | | TC-3 ($1 \times 10^{-5}$ M) | | | | | |
| *G* | TC-1 ($1 \times 10^{-4}$ M) | | | TC-2 ($1 \times 10^{-4}$ M) | | | TC-3 ($1 \times 10^{-4}$ M) | | | TB (control del disolvente) | | |
| *H* | TC-1 ($1 \times 10^{-3}$ M) | | | TC-2 ($1 \times 10^{-3}$ M) | | | TC-3 ($1 \times 10^{-3}$ M) | | | | | |

En este ejemplo, el ligando débil es el noretinodrel (NE).

▼M8

*Terminación del ensayo de unión de competencia*

37. Salvo en los pocillos destinados a la unión total y los blancos (de marcado), como se indica en el cuadro 6, se deben colocar en cada pocillo 50 µl de la solución amortiguadora de ensayo, y se deben mezclar con 10 µl de control del disolvente, estrógeno de referencia (E2), ligando débil, no ligando y productos problema, o, según corresponda, con 10 µl de una solución 5 nM de [$^3$H]17β-estradiol. A continuación, se deben añadir a cada placa 30 µl de solución de receptor enfriada con hielo y se mezcla suavemente. La solución de hrERα debe ser el último reactivo que se añada. Las placas de microvaloración del ensayo deben incubarse a temperatura ambiente (22$^o$ a 28$^o$C) durante 2 horas.

*Cuadro 6*

**Volumen de los componentes del ensayo para las placas de un ensayo de unión de competencia, placas de microvaloración.**

| Etapas de preparación | | Excepto los pocillos TB | Pocillos TB | Blanco (de marcado) |
|---|---|---|---|---|
| Volumen de los componentes de los pocillos de reacción indicados arriba y orden de adición | Solución amortiguadora del ensayo a temperatura ambiente | 50 µl | 60 µl | 90 µl |
| | E2 no marcado, ligando débil, no ligando, disolvente y productos problema (*) | 10 µl | – | – |
| | [$^3$H]17β-estradiol para obtener una concentración final de 0,5 nM (es decir, 5 nM) | 10 µl | 10 µl | 10 µl |
| | Concentración de hrERα según se haya determinado (véanse los puntos 12-13) | 30 µl | 30 µl | – |
| Volumen total en cada pocillo del ensayo | | 100 µl | 100 µl | 100 µl |

(*) Adecuadamente preparados para obtener la concentración final dentro del intervalo aceptable de concentraciones del disolvente.

38. A continuación debe llevarse a cabo la cuantificación del [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα, tras la separación del [$^3$H]17β-estradiol unido al hrERα respecto al [$^3$H]17β-estradiol libre mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de suspensión de DCC enfriada con hielo, como se describe en los puntos 21 a 23 del apéndice 3 en relación con el ensayo de unión de saturación.

39. Los pocillos G10-12 y H10-12 [identificados como blanco (de marcado) en el cuadro 4] presentan las dpm del estradiol marcado con [$^3$H] en 10 µl. La alícuota de 10 µl debe añadirse directamente al líquido de centelleo.

**Criterios de aceptabilidad**

*Ensayo de unión de saturación*

40. La curva de la unión específica debe alcanzar una meseta a medida que se utilizan concentraciones crecientes de [$^3$H]17β-estradiol, lo que indica la saturación del hrERα con el ligando.

41. La unión específica a la concentración de 0,5 nM de [$^3$H]17β-estradiol debe situarse en el intervalo aceptable del 30 % - 50 % de la radiactividad total medida media que se ha añadido en todas las tandas. Pueden aceptarse ligeras salidas fuera de este intervalo, pero si las tandas están sistemáticamente fuera del mismo o una tanda concreta se sitúa significativamente fuera de este intervalo, debe ajustarse la concentración de proteínas y repetirse el ensayo de saturación.

▼M8

42. Los datos deben corresponder a una gráfica lineal de Scatchard.

43. La unión inespecífica no debe ser excesiva. El valor de la unión inespecífica debe ser típicamente < 35 % de la unión total. Sin embargo, la proporción puede superar ocasionalmente este límite cuando se miden valores muy bajos de dpm con la concentración más baja de 17β-estradiol radiomarcado.

*Ensayo de unión de competencia*

44. El aumento de las concentraciones de 17β-estradiol no marcado debe desplazar el [$^3$H]17β-estradiol del receptor de manera coherente con una unión de competencia a un solo punto.

45. El valor de $CI_{50}$ para el estrógeno de referencia (es decir, el 17β-estradiol) debe ser aproximadamente igual a la concentración molar del [$^3$H]17β-estradiol más la Kd determinada a partir del ensayo de unión de saturación.

46. La unión específica total debe estar sistemáticamente dentro del intervalo aceptable del 40 ± 10 % cuando la concentración media medida de la radiactividad total añadida a cada pocillo es de 0,5 nM en todas las tandas. Pueden aceptarse ligeras salidas fuera de este intervalo, pero si las tandas están sistemáticamente fuera del mismo o una tanda concreta se sitúa significativamente fuera de este intervalo, debe ajustarse la concentración de proteínas.

47. El disolvente no debe alterar la sensibilidad ni la reproducibilidad del ensayo. Los resultados del control del disolvente (pocillos TB) se comparan con el testigo de la solución amortiguadora para verificar que el disolvente utilizado no afecta al sistema de ensayo. Los resultados del testigo de la TB y de la solución amortiguadora deben ser comparables si el disolvente no produce ningún efecto sobre el ensayo.

48. El no ligando no debe desplazar más del 25 % del [$^3$H]17β-estradiol del hrERα cuando se somete a ensayo hasta la concentración de $10^{-3}$ M (OTES) o $10^{-4}$ M (DBP).

49. Se han establecido criterios de comportamiento para el estrógeno de referencia y dos ligandos débiles (por ejemplo, noretinodrel, noretindrona) utilizando los datos del estudio de validación del ensayo del CERI de unión al hrER (anexo N de la referencia 2). Se aportan los intervalos de confianza del 95 % para la media (n) ± DT de todas las tandas de los testigos en cuatro laboratorios participantes en el estudio de validación. Se calcularon los intervalos de confianza del 95 % para los parámetros de ajuste de las curvas (es decir, parte superior, parte inferior, pendiente de Hill y log $CI_{50}$) en relación con el estrógeno de referencia y los ligandos débiles, y para el $\log_{10}$ RBA de los ligandos débiles en relación con el estrógeno de referencia. En el cuadro 1 se ofrecen los intervalos previstos para los parámetros de ajuste de la curva que pueden utilizarse como criterios de comportamiento. En la práctica, el intervalo de la $CI_{50}$ puede variar ligeramente según la Kd obtenida experimentalmente del preparado del receptor y la concentración del ligando.

50. No se han establecido criterios de comportamiento sobre los parámetros de ajuste de la curva en relación con los productos problema debido a la amplia gama de productos problema que puede haber y a la variación de las posibles afinidades y resultados (por ejemplo, ajuste de la curva completa o de la curva parcial, o sin ajuste alguno). Sin embargo, a la hora de revisar los resultados de cada tanda correspondientes a un producto problema, debe aplicarse un juicio profesional. Debe utilizarse un intervalo suficiente de

▼M8

concentraciones del producto problema para definir claramente la parte superior (p. ej., 90 - 100 % de unión) de la curva de competencia. La variabilidad entre las réplicas de cada concentración del producto problema, así como entre las tres tandas en momentos diferentes, debe ser razonable y científicamente justificable. Los testigos de cada tanda de un producto problema deben aproximarse a las medidas de comportamiento notificadas para este ensayo del CERI y deben ser coherentes con los datos históricos de los testigos de cada laboratorio respectivo.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

**Ensayo de unión de saturación**

51. Se mide tanto la unión total como la inespecífica. A partir de estos valores, se calcula la unión específica con concentraciones en aumento de [$^3$H]17β-estradiol en condiciones de equilibrio, restando la inespecífica de la total. La gráfica de la unión específica frente a la concentración de [$^3$H]17β-estradiol debe alcanzar una meseta para la unión específica máxima, lo cual indica la saturación del hrERα con el [$^3$H]17β-estradiol. Por otra parte, el análisis de los datos debe documentar la unión del [$^3$H]17β-estradiol a un solo punto de unión de elevada afinidad. En la curva de unión de saturación deben ponerse de manifiesto la unión inespecífica, la total y la específica. El posterior análisis de estos datos debe utilizar una regresión no lineal (por ejemplo, BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995) con una representación final de los datos como gráfica de Scatchard.

52. El análisis de los datos debe determinar los parámetros Bmax y Kd a partir solo de los datos de unión total, aceptando que la unión inespecífica es lineal, salvo que se justifique utilizar otro método. Además, a la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. Debe indicarse el método elegido para la regresión sólida. Al determinar los parámetros Bmax y Kd a partir de los datos de la unión de saturación, siempre debe aplicarse una corrección para tener en cuenta el agotamiento de los ligandos (p. ej., utilizando el método de Swillens, 1995).

**Ensayo de unión de competencia**

53. La curva de unión de competencia se representa gráficamente como la unión específica del [$^3$H]17β-estradiol frente a la concentración (unidades $\log_{10}$) del competidor. La concentración del producto problema que inhibe el 50 % de la unión máxima específica del [$^3$H]17β-estradiol es el valor de la $CI_{50}$.

54. Deben estimarse los valores de log $CI_{50}$ de los testigos positivos (p. ej., el estrógeno de referencia y el ligando débil), utilizando un programa informático adecuado de ajuste de curvas no lineales para ajustarse a una ecuación de Hill de cuatro parámetros (p. ej., BioSoft; McPherson, 1985; Motulsky, 1995). La parte superior, la parte inferior, la pendiente y log $CI_{50}$ deben dejarse, por lo general, sin restricciones cuando se ajustan estas curvas. A la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. No debe utilizarse ninguna corrección por el agotamiento de los ligandos. Tras el análisis inicial, debe revisarse cada curva de los ligandos para garantizar que se ajusta adecuadamente al modelo. La afinidad relativa de unión (RBA) del ligando débil debe calcularse como porcentaje del log $CI_{50}$ del ligando débil respecto al log $CI_{50}$ del 17β-estradiol. Los resultados de los testigos positivos y del testigo de no ligando deben evaluarse utilizando las medidas del comportamiento del ensayo de los puntos 44 - 49 del presente apéndice 3.

▼M8

55. Los datos de todos los productos problema deben analizarse utilizando un enfoque gradual para garantizar que los datos se analizan de forma adecuada y que cada curva de unión de competencia se clasifica correctamente. Se recomienda que cada tanda con el producto problema se someta inicialmente a un análisis de datos normalizado idéntico al utilizado con el estrógeno de referencia y los testigos de ligandos débiles (véase el punto 54 del presente apéndice 3). Tras este análisis inicial, debe llevarse a cabo una revisión técnica de los parámetros de ajuste de la curva, así como un examen visual sobre el grado de calidad del ajuste de los datos con la curva de la unión de competencia generada en cada tanda. Durante esta revisión técnica, la observación de una disminución dependiente de la concentración en el porcentaje de [$^3$H]17β-estradiol unido específicamente, la de una baja variabilidad entre las réplicas técnicas de cada concentración de producto problema, y la de la coherencia de los parámetros de ajuste entre las tres tandas son una buena indicación de que el ensayo y los análisis de datos se han llevado a cabo adecuadamente.

**Interpretación de los datos**

56. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que un producto problema es un ligando del hrERα si puede ajustarse una curva de unión y el punto más bajo de la curva de respuesta dentro del intervalo de los datos es inferior al 50 % (figura 1).

57. Siempre que se cumplan todos los criterios de aceptabilidad, se considera que el producto problema es no ligando del hrERα si:

— puede ajustarse una curva de unión y el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada dentro del intervalo de datos es superior al 75 %, o

— no puede ajustarse una curva de unión y la unión porcentual media sin suavizar más baja entre los grupos de concentración de los datos es superior al 75 %.

58. Los productos problema se consideran dudosos si no se cumple ninguna de las condiciones anteriores (por ejemplo, el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada se sitúa entre el 76 y el 51 %).

*Cuadro 7*

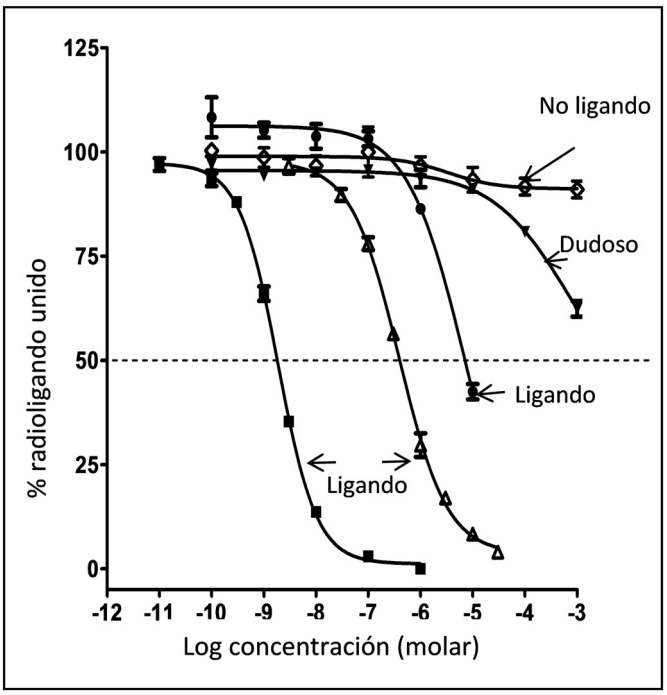
**Criterios de asignación de la clasificación a un producto problema sobre la base de una curva de unión de competencia**

| Clasificación | Criterios |
|---|---|
| Ligando[a] | Puede ajustarse una curva de unión.<br>El **punto más bajo de la curva de respuesta dentro del intervalo de datos es inferior al 50 %**. |
| No ligando[b] | Si puede ajustarse una curva de unión,<br>el **punto más bajo de la curva de respuesta ajustada dentro del intervalo de datos es superior al 75 %**.<br>Si no puede ajustarse una curva de unión,<br>la **unión porcentual media sin suavizar más baja entre los grupos de concentración de los datos es superior al 75 %**. |
| Dudoso[c] | Cualquier producto sometido al ensayo que no sea ni ligando ni no ligando<br>(p. ej., el punto más bajo de la curva de respuesta ajustada se sitúa entre el 76 y el 51 %). |

▼M8

*Figura 1*

**Ejemplos de clasificación de productos problema utilizando una curva de unión de competencia.**




59. Se combinan las diversas tandas realizadas con un producto problema dentro de un laboratorio, asignando un valor numérico a cada tanda y promediando entre ellas, como se muestra en el cuadro 8. Los resultados de las tandas combinadas dentro de cada laboratorio se comparan con la clasificación prevista de cada producto problema.

*Cuadro 8*

**Método de clasificación del producto problema mediante varias tandas dentro de un laboratorio**

| Asignar valor a cada tanda: | |
|---|---|
| **Clasificación** | **Valor numérico** |
| Ligando | 2 |
| Dudoso | 1 |
| No ligando | 0 |
| Clasificar según la media de los valores numéricos de las tandas: | |
| **Clasificación** | **Valor numérico** |
| Ligando | Media ≥ 1,5 |
| Dudoso | 0,5 ≤ Media < 1,5 |
| No ligando | Media < 0,5 |

INFORME DEL ENSAYO

60. Véase el punto 24 de la sección «COMPONENTES DEL ENSAYO DE UNIÓN AL hrER» de este método de ensayo.

▼**M8**

*Apéndice 3.1*

RELACIÓN DE TÉRMINOS

**[$^3$H]E2:** 17β-estradiol radiomarcado con tritio.

**DCC:** Carbón recubierto de dextrano.

**E2:** 17β-Estradiol no marcado (inerte).

**Solución amortiguadora del ensayo:** Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, con EDTA 1 mM, EGTA 1mM, $NaVO_3$ 1 mM, 10 % de glicerol, leupeptina 0,2 mM, ditiotreitol 1 mM y 10 mg/ml de seroalbúmina bovina.

**hrERα:** Receptor estrogénico recombinante humano alfa (dominio de unión al ligando).

**Réplica:** Cada uno de los diversos pocillos que tienen el mismo contenido a la misma concentración y se someten a ensayo simultáneamente dentro de una misma tanda. En este protocolo, cada concentración del producto problema se somete al ensayo por triplicado; es decir, hay tres réplicas que se someten simultáneamente al ensayo con cada concentración del producto problema.

**Tanda:** Conjunto completo de pocillos de ensayo en placas de microvaloración sometidos a ensayo a la vez, que aporta toda la información necesaria para caracterizar la unión de un producto problema al hrERα (a saber, [$^3$H]17β-estradiol total añadido al pocillo de ensayo, unión máxima del [$^3$H]17β-estradiol al hrERα, unión inespecífica, y unión total a diversas concentraciones del producto problema). Una tanda podría consistir simplemente en un solo pocillo (es decir, una réplica) por concentración, pero, puesto que este protocolo requiere que los ensayos se realicen por triplicado, una tanda estará compuesta por tres pocillos de ensayo por cada concentración. Además, este protocolo exige la realización de tres tandas independientes (es decir, no simultáneas) por producto.

▼**M8**

*Apéndice 3.2*

DISTRIBUCIÓN DE LOS POCILLOS PARA EL ENSAYO DE UNIÓN DE COMPETENCIA

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | A1 | 1 | Blanco | BK | BK1 | — | — | — | — | — | — | — |
| S | A2 | 2 | Blanco | BK | BK2 | — | — | — | — | — | — | — |
| S | A3 | 3 | Blanco | BK | BK3 | — | — | — | — | — | — | — |
| S | B1 | 1 | E2 no marcado | S | S1 | 1,00E-10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-11 |
| S | B2 | 2 | E2 no marcado | S | S1 | 1,00E-10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-11 |
| S | B3 | 3 | E2 no marcado | S | S1 | 1,00E-10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-11 |
| S | C1 | 1 | E2 no marcado | S | S2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| S | C2 | 2 | E2 no marcado | S | S2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| S | C3 | 3 | E2 no marcado | S | S2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| S | D1 | 1 | E2 no marcado | S | S3 | 3,16E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-10 |
| S | D2 | 2 | E2 no marcado | S | S3 | 3,16E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-10 |
| S | D3 | 3 | E2 no marcado | S | S3 | 3,16E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-10 |
| S | E1 | 1 | E2 no marcado | S | S4 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | E2 | 2 | E2 no marcado | S | S4 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | E3 | 3 | E2 no marcado | S | S4 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | F1 | 1 | E2 no marcado | S | S5 | 3,16E-08 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-09 |
| S | F2 | 2 | E2 no marcado | S | S5 | 3,16E-08 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-09 |
| S | F3 | 3 | E2 no marcado | S | S5 | 3,16E-08 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-09 |
| S | G1 | 1 | E2 no marcado | S | S6 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | G2 | 2 | E2 no marcado | S | S6 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| S | G3 | 3 | E2 no marcado | S | S6 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| S | H1 | 1 | E2 no marcado | S | S7 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | H2 | 2 | E2 no marcado | S | S7 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | H3 | 3 | E2 no marcado | S | S7 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | A4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | A5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | A6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | B4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP2 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| S | B5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP2 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| S | B6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP2 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| S | C4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP3 | 3,16E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-08 |
| S | C5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP3 | 3,16E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-08 |
| S | C6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP3 | 3,16E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-08 |
| S | D4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | D5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | D6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | E4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP5 | 3,16E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-07 |
| S | E5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP5 | 3,16E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-07 |
| S | E6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP5 | 3,16E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-07 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | F4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP6 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | F5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP6 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | F6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP6 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | G4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP7 | 3,16E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-06 |
| S | G5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP7 | 3,16E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-06 |
| S | G6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP7 | 3,16E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-06 |
| S | H4 | 1 | Noretinodrel | NE | WP8 | 3,16E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-05 |
| S | H5 | 2 | Noretinodrel | NE | WP8 | 3,16E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-05 |
| S | H6 | 3 | Noretinodrel | NE | WP8 | 3,16E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 3,2E-05 |
| S | A7 | 1 | OTES | N | OTES1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| S | A8 | 2 | OTES | N | OTES1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| S | A9 | 3 | OTES | N | OTES1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| S | B7 | 1 | OTES | N | OTES2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | B8 | 2 | OTES | N | OTES2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | B9 | 3 | OTES | N | OTES2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| S | C7 | 1 | OTES | N | OTES3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| S | C8 | 2 | OTES | N | OTES3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| S | C9 | 3 | OTES | N | OTES3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| S | D7 | 1 | OTES | N | OTES4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | D8 | 2 | OTES | N | OTES4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | D9 | 3 | OTES | N | OTES4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| S | E7 | 1 | OTES | N | OTES5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | E8 | 2 | OTES | N | OTES5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | E9 | 3 | OTES | N | OTES5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | F7 | 1 | OTES | N | OTES6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| S | F8 | 2 | OTES | N | OTES6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| S | F9 | 3 | OTES | N | OTES6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| S | G7 | 1 | OTES | N | OTES7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| S | G8 | 2 | OTES | N | OTES7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| S | G9 | 3 | OTES | N | OTES7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| S | H7 | 1 | OTES | N | OTES8DB-P7 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| S | H8 | 2 | OTES | N | OTES88 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| S | H9 | 3 | OTES | N | OTES8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| S | A10 | 1 | Unión total | TB | TB1 | | 30 | 60 | 10 | — | 100 | |
| S | A11 | 2 | Unión total | TB | TB2 | — | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| S | A12 | 3 | Unión total | TB | TB3 | — | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| S | B10 | 4 | Unión total | TB | TB4 | — | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| S | B11 | 5 | Unión total | TB | TB5 | — | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| S | B12 | 6 | Unión total | TB | TB6 | — | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| S | C10 | 1 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S1 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | C11 | 2 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S2 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | C12 | 3 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S3 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | D10 | 4 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S4 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | D11 | 5 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | D12 | 6 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S6 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| S | E10 | 1 | Testigo de la solución amortiguadora | BC | BC1 | | | 100 | | | 100 | |
| S | E11 | 2 | Testigo de la solución amortiguadora | BC | BC2 | | | 100 | | | 100 | |
| S | E12 | 3 | Testigo de la solución amortiguadora | BC | BC3 | | | 100 | | | 100 | |
| S | F10 | 4 | Testigo de la solución amortiguadora | BC | BC4 | | | 100 | | | 100 | |
| S | F11 | 5 | Testigo de la solución amortiguadora | BC | BC5 | | | 100 | | | 100 | |
| S | F12 | 6 | Testigo de la solución amortiguadora | BC | BC6 | | | 100 | | | 100 | |
| S | G10 (*) | 1 | Blanco (de marcado) | Marcado | H1 | | 90 | | 10 | | 100 | |
| S | G11 (*) | 2 | Blanco (de marcado) | Marcado | H2 | | 90 | | 10 | | 100 | |
| S | G12 (*) | 3 | Blanco (de marcado) | Marcado | H3 | | 90 | | 10 | | 100 | |
| S | H10 (*) | 4 | Blanco (de marcado) | Marcado | H4 | | 90 | | 10 | | 100 | |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| S | H11 (*) | 5 | Blanco (de marcado) | Marcado | H5 | | 90 | | 10 | | 100 | |
| S | H12 | 6 | Blanco (de marcado) | Marcado | H6 | | 90 | | 10 | | 100 | |
| P1 | A1 | 1 | Desconocido 1 | U1 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| P1 | A2 | 2 | Desconocido 1 | U1 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| P1 | A3 | 3 | Desconocido 1 | U1 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| P1 | B1 | 1 | Desconocido 1 | U1 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | B2 | 2 | Desconocido 1 | U1 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | B3 | 3 | Desconocido 1 | U1 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | C1 | 1 | Desconocido 1 | U1 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | C2 | 2 | Desconocido 1 | U1 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | C3 | 3 | Desconocido 1 | U1 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | D1 | 1 | Desconocido 1 | U1 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | D2 | 2 | Desconocido 1 | U1 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | D3 | 3 | Desconocido 1 | U1 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | E1 | 1 | Desconocido 1 | U1 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | E2 | 2 | Desconocido 1 | U1 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | E3 | 3 | Desconocido 1 | U1 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | F1 | 1 | Desconocido 1 | U1 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | F2 | 2 | Desconocido 1 | U1 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | F3 | 3 | Desconocido 1 | U1 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | G1 | 1 | Desconocido 1 | U1 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | G2 | 2 | Desconocido 1 | U1 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | G3 | 3 | Desconocido 1 | U1 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | H1 | 1 | Desconocido 1 | U1 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| P1 | H2 | 2 | Desconocido 1 | U1 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | H3 | 3 | Desconocido 1 | U1 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| P1 | A4 | 1 | Desconocido 2 | U2 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| P1 | A5 | 2 | Desconocido 2 | U2 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| P1 | A6 | 3 | Desconocido 2 | U2 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| P1 | B4 | 1 | Desconocido 2 | U2 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | B5 | 2 | Desconocido 2 | U2 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | B6 | 3 | Desconocido 2 | U2 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | C4 | 1 | Desconocido 2 | U2 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | C5 | 2 | Desconocido 2 | U2 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | C6 | 3 | Desconocido 2 | U2 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | D4 | 1 | Desconocido 2 | U2 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | D5 | 2 | Desconocido 2 | U2 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | D6 | 3 | Desconocido 2 | U2 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | E4 | 1 | Desconocido 2 | U2 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | E5 | 2 | Desconocido 2 | U2 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | E6 | 3 | Desconocido 2 | U2 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | F4 | 1 | Desconocido 2 | U2 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | F5 | 2 | Desconocido 2 | U2 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | F6 | 3 | Desconocido 2 | U2 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | G4 | 1 | Desconocido 2 | U2 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | G5 | 2 | Desconocido 2 | U2 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | G6 | 3 | Desconocido 2 | U2 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | H4 | 1 | Desconocido 2 | U2 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| P1 | H5 | 2 | Desconocido 2 | U2 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| P1 | H6 | 3 | Desconocido 2 | U2 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| P1 | A7 | 1 | Desconocido 3 | U3 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| P1 | A8 | 2 | Desconocido 3 | U3 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | A9 | 3 | Desconocido 3 | U3 | 1 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-10 |
| P1 | B7 | 1 | Desconocido 3 | U3 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | B8 | 2 | Desconocido 3 | U3 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | B9 | 3 | Desconocido 3 | U3 | 2 | 1,00E-09 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-09 |
| P1 | C7 | 1 | Desconocido 3 | U3 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | C8 | 2 | Desconocido 3 | U3 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | C9 | 3 | Desconocido 3 | U3 | 3 | 1,00E-07 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-08 |
| P1 | D7 | 1 | Desconocido 3 | U3 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | D8 | 2 | Desconocido 3 | U3 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | D9 | 3 | Desconocido 3 | U3 | 4 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-07 |
| P1 | E7 | 1 | Desconocido 3 | U3 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | E8 | 2 | Desconocido 3 | U3 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | E9 | 3 | Desconocido 3 | U3 | 5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | F7 | 1 | Desconocido 3 | U3 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | F8 | 2 | Desconocido 3 | U3 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | F9 | 3 | Desconocido 3 | U3 | 6 | 1,00E-04 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-05 |
| P1 | G7 | 1 | Desconocido 3 | U3 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | G8 | 2 | Desconocido 3 | U3 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | G9 | 3 | Desconocido 3 | U3 | 7 | 1,00E-03 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-04 |
| P1 | H7 | 1 | Desconocido 3 | U3 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| P1 | H8 | 2 | Desconocido 3 | U3 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| P1 | H9 | 3 | Desconocido 3 | U3 | 8 | 1,00E-02 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-03 |
| P1 | A10 | 1 | Testigo E2 (máx) | S | E2max1 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,00E-07 |
| P1 | A11 | 2 | Testigo E2 (máx) | S | E2max2 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,00E-07 |
| P1 | A12 | 3 | Testigo E2 (máx) | S | E2max3 | 1,00E-06 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,00E-07 |
| P1 | B10 | 1 | Testigo E2 ($CI_{50}$) | S | E2IC501 | E2IC50x10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | E2IC50 |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | B11 | 2 | Testigo E2 ($CI_{50}$) | S | E2IC502 | E2IC50x10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | E2IC50 |
| P1 | B12 | 3 | Testigo E2 ($CI_{50}$) | S | E2IC503 | E2IC50x10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | E2IC50 |
| P1 | C10 | 1 | Testigo NE (máx) | S | Nemax1 | 1,00E-3,5 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,00E-4,5 |
| P1 | C11 | 2 | Testigo NE (máx) | S | Nemax2 | 1,00E-3,5 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,00E-4,5 |
| P1 | C12 | 3 | Testigo NE (máx) | S | Nemax3 | 1,00E-3,5 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,00E-4,5 |
| P1 | D10 | 1 | Testigo NE ($CI_{50}$) | S | NE $CI_{50}$1 | NE $CI_{50}$ x10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | NE $CI_{50}$ |
| P1 | D11 | 2 | Testigo NE ($CI_{50}$) | S | NE $CI_{50}$2 | NE $CI_{50}$ x10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | NE $CI_{50}$ |
| P1 | D12 | 3 | Testigo NE ($CI_{50}$) | S | NE $CI_{50}$3 | NE $CI_{50}$ x10 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | NE $CI_{50}$ |
| P1 | E10 | 1 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S1 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | E11 | 2 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S2 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | E12 | 3 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S3 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | F10 | 4 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S4 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | F11 | 5 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S5 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | F12 | 6 | E2 no marcado (elevada) | NSB | S6 | 1,00E-05 | 30 | 50 | 10 | 10 | 100 | 1,0E-06 |
| P1 | G10 | 1 | Unión total | TB | TB1 | | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| P1 | G11 | 2 | Unión total | TB | TB2 | | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| P1 | G12 | 3 | Unión total | TB | TB3 | | 30 | 60 | 10 | | 100 | |

▼**M8**

| Placa | Posición | Réplica | Tipo de pocillo | Código del pocillo | Código de la concentración | Concentración inicial del competidor (M) | Solución madre de hrER (µl) | Volumen de solución amortiguadora (µl) | Volumen del marcador (E2 marcado) (µl) | Volumen tomado de la placa de dilución (µL) | Volumen final (µl) | Concentración final del competidor (M) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 | H10 | 4 | Unión total | TB | TB4 | | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| P1 | H11 | 5 | Unión total | TB | TB5 | | 30 | 60 | 10 | | 100 | |
| P1 | H12 | 6 | Unión total | TB | TB6 | | 30 | 60 | 10 | | 100 | |

(*) Obsérvese que los pocillos «marcados» están vacíos durante la incubación. Los 10 µl se añaden solo para el recuento de centelleo.

▼**M8**

*Apéndice 4*

CONSIDERACIONES PARA EL ANÁLISIS DE LOS DATOS PROCEDENTES DEL ANÁLISIS DE LA UNIÓN DE COMPETENCIA AL HRER

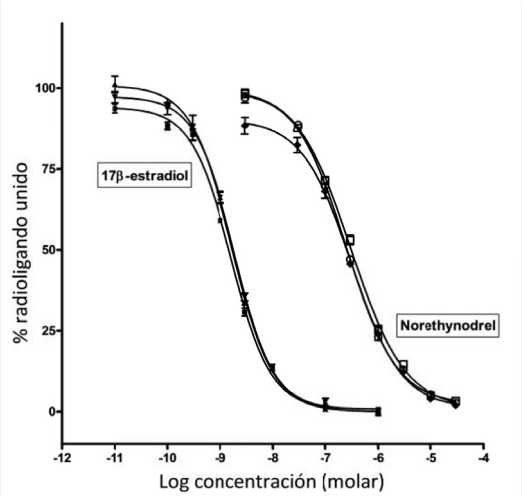
1. El ensayo de unión de competencia al hrERα mide la unión de una única concentración de [$^3$H]17β-estradiol en presencia de concentraciones cada vez mayores de un producto problema. La curva de la unión de competencia se representa gráficamente como la unión específica del [$^3$H]17β-estradiol frente a la concentración (unidades $\log_{10}$) del competidor. La concentración del producto problema que inhibe el 50 % de la unión máxima específica del [3H]17β-estradiol es la $CI_{50}$.

Análisis de datos para el estrógeno de referencia y el ligando débil (1)

2. Los datos de las tandas de testigos se transforman (es decir, el porcentaje de la unión específica del [$^3$H]17β-estradiol y la concentración logarítmcia del producto testigo) para su posterior análisis. Deben estimarse los valores de log $CI_{50}$ de los testigos positivos (p. ej., el estrógeno de referencia y el ligando débil), utilizando un programa informático adecuado de ajuste de curvas no lineales para ajustarse a una ecuación de Hill de cuatro parámetros (p. ej., BioSoft; GraphPad Prism) (2). La parte superior, la parte inferior, la pendiente y log $CI_{50}$ pueden dejarse, por lo general, sin restricciones cuando se ajustan estas curvas. A la hora de determinar el mejor ajuste debe utilizarse una regresión sólida, salvo que se justifique otra opción. Debe indicarse el método elegido para la regresión sólida. No fue necesario utilizar ninguna corrección para tener en cuenta el agotamiento de los ligandos en los ensayos FW o CERI, pero puede considerarse en caso necesario. Tras el análisis inicial, debe revisarse cada curva de los ligandos para garantizar que se ajusta adecuadamente al modelo. La afinidad relativa de unión (RBA) del ligando débil puede calcularse como porcentaje del log $CI_{50}$ del ligando débil respecto al log $CI_{50}$ del 17β-estradiol. Los resultados de los testigos positivos y del testigo de no ligando deben evaluarse utilizando medidas de comportamiento del ensayo y criterios de aceptabilidad, tal como se describe en el presente método de ensayo (punto 20), en el apéndice 2 (ensayo de FW, antes citado, puntos 41 a 51) y en el apéndice 3 (ensayo del CERI, puntos 41 a 51). En la figura 1 se muestran ejemplos de tres tandas para el estrógeno de referencia y el ligando débil.

*Figura 1*

**Ejemplos de curvas de la unión de competencia para el estrógeno de referencia y para el ligando débil testigo.**



▼**M8**

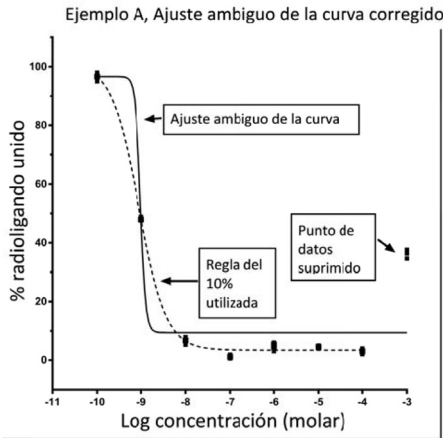
Análisis de datos de los productos problema

3. Los datos de todos los productos problema deben analizarse utilizando un enfoque gradual para garantizar que los datos se analizan de forma adecuada y que cada curva de la unión de competencia se clasifica correctamente. Cada tanda con el producto problema debe someterse inicialmente a un análisis de datos normalizado idéntico al utilizado con el estrógeno de referencia y los testigos de ligandos débiles. Tras este análisis inicial, debe llevarse a cabo una revisión técnica de los parámetros de ajuste de la curva, así como un examen visual sobre el grado de calidad del ajuste de los datos con la curva de la unión de competencia generada en cada tanda. Durante esta revisión técnica, la observación de una disminución dependiente de la concentración en el porcentaje de [$^3$H]17β-estradiol unido específicamente, la de una baja variabilidad entre las réplicas técnicas de cada concentración de producto, y la de la coherencia de los parámetros de ajuste entre las tres tandas son una buena indicación de que el ensayo y los análisis de datos se han llevado a cabo adecuadamente. A la hora de revisar los resultados de cada tanda correspondientes a un producto problema, debe aplicarse un juicio profesional, y los datos utilizados para clasificar cada producto problema como ligando o no ligando deben ser científicamente justificables.

4. En ocasiones puede haber ejemplos de datos que requieran una atención adicional para analizar e interpretar adecuadamente los datos de unión al hrER. Los estudios anteriores habían mostrado casos en los que el análisis y la interpretación de los datos sobre la unión a receptores de competencia pueden complicarse debido a un aumento del porcentaje de la unión específica cuando se someten a ensayo productos a las concentraciones más altas (figura 2). Se trata de una cuestión muy conocida que se ha presentado al utilizar protocolos para una serie de ensayos de unión a receptores de competencia (3). En estos casos, se observa una respuesta dependiente de la concentración a concentraciones más bajas pero, al aproximarse la concentración del producto problema al límite de solubilidad, el desplazamiento del [$^3$H]17β-estradiol deja de disminuir. En estos casos, los datos de las concentraciones más elevadas indican que se ha alcanzado el límite biológico del ensayo. Por ejemplo, este fenómeno se asocia muchas veces a la insolubilidad y la precipitación del producto a altas concentraciones, o también puede ser un reflejo de la superación de la capacidad que tiene el carbón recubierto de dextrano para atrapar el ligando radiomarcado libre durante el procedimiento de separación a las concentraciones más elevadas del producto. El incluir estos puntos de datos cuando se ajustan los datos de la unión de competencia a una curva sigmoidea puede dar lugar a veces a una clasificación errónea del potencial de unión al ER de un producto problema (figura 2). Para evitarlo, el protocolo de los ensayos de unión al hrER de FW y del CERI incluye una opción para excluir de los análisis los puntos de datos en los que la media de las réplicas del porcentaje de unión específica del [$^3$H]17β-estradiol supera al menos en el 10 % a la media observada a una concentración inferior (esto es lo que suele denominarse la regla del 10 %). Esta regla solo puede utilizarse una vez con una curva determinada y deben seguir quedando datos correspondientes a un mínimo de seis concentraciones, de forma que la curva pueda clasificarse correctamente.

*Figura 2*

**Ejemplos de curvas de unión de competencia con y sin aplicación de la regla del 10 %**

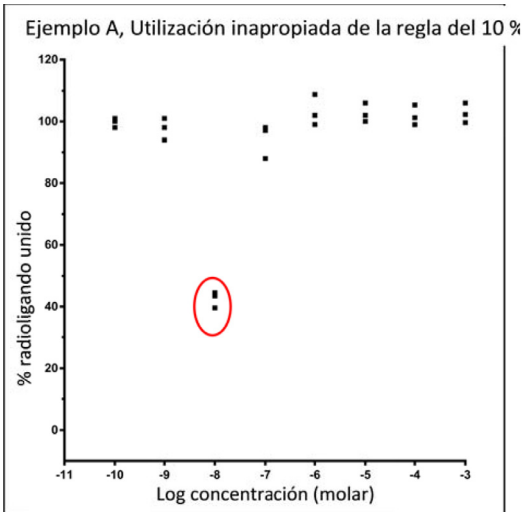


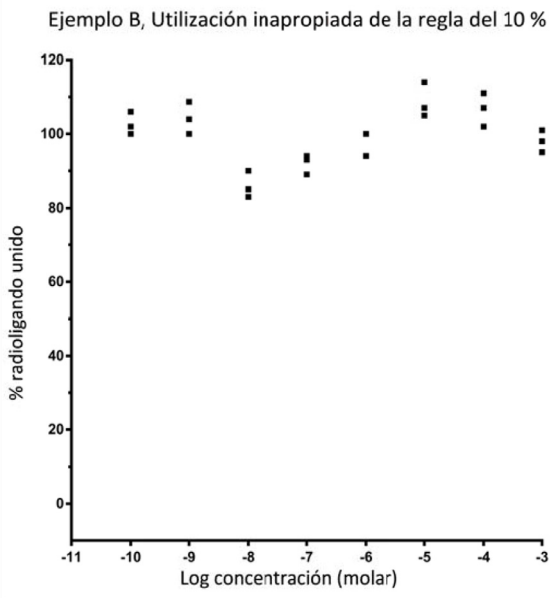
▼**M8**

5. El uso adecuado de la regla del 10 % para corregir estas curvas debe considerarse cuidadosamente y reservarse para aquellos casos en los que haya una clara indicación de unión al hrER. Durante la realización de experimentos para el estudio de validación del ensayo de unión al hrER de FW, se observó que la regla del 10 % tenía a veces una consecuencia imprevista y no deseada. Los productos que no interactuaban con el receptor (es decir, los no ligandos verdaderos) a menudo presentaban una variabilidad alrededor del 100 % de unión del radioligando que era superior al 10 % en toda la gama de concentraciones ensayadas. Si resultaba que el valor más bajo se encontraba a una concentración baja, los datos de todas las concentraciones superiores podrían eliminarse del análisis utilizando la regla del 10 %, aunque tales concentraciones podrían ser útiles para establecer que el producto es un ligando. El gráfico 3 muestra ejemplos en los que el uso de la regla del 10 % no es adecuado.

*Figura 3*

**Ejemplos de datos de unión de competencia en los que la utilización de la regla del 10 % no es adecuada**



▼**M8**

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2015). *Integrated Summary Report: Validation of Two Binding Assays Using Human Recombinant Estrogen Receptor Alpha (hrERα)*, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No 226), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(2) Motulsky H. and Christopoulos A. (2003). *The law of mass action, In Fitting Models to Biological Data Using Linear and Non-linear Regression*. GraphPad Software Inc., San Diego, CA, pp 187-191. Www.graphpad.com/manuals/Prism4/RegressionBook.pdf

(3) Laws SC, Yavanhxay S, Cooper RL, Eldridge JC. (2006). *Nature of the Binding Interaction for 50 Structurally Diverse Chemicals with Rat Estrogen Receptors*. Toxicological Sci. 94(1):46-56.

▼M8

B.71. **ESTUDIOS DE SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO* RELATIVOS AL FENÓMENO CLAVE DE LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA RUTA DE RESULTADOS ADVERSOS (AOP) DE LA SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA**

INTRODUCCIÓN GENERAL

**Método de ensayo basado en el fenómeno clave de la activación de las células dendríticas**

1. Un sensibilizante cutáneo es una sustancia que induce una respuesta alérgica por contacto con la piel, tal como se define en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas) (1) y en el Reglamento (UE) n.º 1272/2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas (CLP) de la Unión Europea ([1]). Existe un acuerdo general sobre los principales fenómenos biológicos subyacentes a la sensibilización cutánea. El conocimiento actual de los mecanismos químicos y biológicos asociados a la sensibilización cutánea se ha resumido como una ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*) en el marco del programa AOP de la OCDE (2), empezando por el fenómeno iniciador molecular y pasando por fenómenos intermedios hasta llegar al efecto adverso, a saber, la dermatitis alérgica de contacto. En este caso, el fenómeno iniciador molecular (es decir, el primer fenómeno clave) es la unión covalente de sustancias electrofílicas a los centros nucleofílicos de las proteínas de la piel. El segundo fenómeno clave en esta AOP tiene lugar en los queratinocitos e incluye respuestas inflamatorias, así como cambios en la expresión génica relacionada con rutas específicas de comunicación celular, tales como las rutas dependientes del elemento de respuesta antioxidante/electrófilo (ARE, antioxidant/electrophile response element). El tercer fenómeno clave es la activación de las células dendríticas (DC, *dendritic cells*), normalmente evaluada por la expresión de marcadores específicos de superficie celular, quimiocinas y citocinas. El cuarto fenómeno clave es la activación y proliferación de las células T, que se evalúa indirectamente en el ensayo con ganglios linfáticos locales (LLNA, *Local Lymph Node Assay*) de múridos (3).

2. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 442E de la OCDE (2017). Describe los ensayos *in vitro* que abordan los mecanismos descritos en el fenómeno clave de la activación de las células dendríticas en la AOP de la sensibilización cutánea (2). El método de ensayo comprende los ensayos que deben utilizarse para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes de conformidad con el SGA de las Naciones Unidas y el CLP.

   Los ensayos descritos en el presente método de ensayo son los siguientes:

   — Ensayo de activación de la línea celular humana (h-CLAT),

   — Ensayo de activación de la línea celular U937 (U-SENS™),

   — Ensayo del gen marcador de la interleucina-8 (ensayo IL-8 Luc).

3. Los ensayos incluidos en el presente método de ensayo y las TG de la OCDE correspondientes pueden diferir en relación con el procedimiento utilizado para generar los datos y los resultados medidos, pero pueden utilizarse de forma indiscriminada para satisfacer los requisitos de los países en cuanto a los resultados de los ensayos relativos al fenómeno clave de la activación de las células dendríticas en la AOP de la sensibilización cutánea, beneficiándose al mismo tiempo de la aceptación mutua de datos de la OCDE.

([1]) Reglamento (CE) n.º 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas y por el que se modifican y derogan las Directivas 67/548/CEE y 1999/45/CE y se modifica el Reglamento (CE) n.º 1907/2006 (DO L 353 de 31.12.2008, p. 1).

▼M8

**Antecedentes y principios de los ensayos incluidos en el método de ensayo basado en el fenómeno clave**

4. Tradicionalmente, la evaluación de la sensibilización cutánea se hacía con animales de laboratorio. Los métodos clásicos con cobayas, como el ensayo de maximización con cobayas (GMPT, *Guinea Pig Maximisation Test*) de Magnusson y Kligman y el ensayo de Buehler (método de ensayo B.6) (4), estudian tanto la fase de inducción como la de desencadenamiento de la sensibilización cutánea. Los ensayos con múridos, el ensayo con ganglios linfáticos locales (LLNA, *Local Lymph Node Assay*) (método de ensayo B.42) (3) y sus dos modificaciones no radiactivas, el LLNA: DA (método de ensayo B.50) (5) y el LLNA: BrdU-ELISA (método de ensayo B.51) (6), evalúan todos la respuesta de inducción exclusivamente, y también han conseguido su reconocimiento, ya que presentan una ventaja en relación con los ensayos con cobayas en términos de bienestar animal, junto con una medición objetiva de la fase de inducción de la sensibilización cutánea.

5. Recientemente se han adoptado para contribuir a la evaluación del potencial de peligro de sensibilización cutánea de los productos varios métodos de ensayo *in chemico* e *in vitro* de base farmacodinámica relativos al primer fenómeno clave (método de ensayo B.59; Ensayo directo de reactividad peptídica) (7) y el segundo fenómeno clave (método de ensayo B.60; Método de ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2) (8) de la AOP de la sensibilización cutánea.

6. Los ensayos descritos en el presente método de ensayo cuantifican el cambio en la expresión de los marcadores de superficie celular asociados al proceso de activación de los monocitos y DC tras la exposición a sensibilizantes (por ejemplo, CD54, CD86), o los cambios en la expresión de la IL-8, citocina asociada a la activación de las DC. Se ha comunicado que ciertos sensibilizantes cutáneos inducen la expresión de marcadores de membrana celular como, por ejemplo, CD40, CD54, CD80, CD83 y CD86, además de inducir la producción de citocinas proinflamatorias, como la IL-1β y la TNF-α, y de varias quimiocinas, como la IL-8 (CXCL8) y la CCL3 (9) (10) (11) (12), asociadas con la activación de las DC (2).

7. Sin embargo, como la activación de las DC representa por sí sola un fenómeno clave de la AOP de la sensibilización cutánea (2) (13), la información generada con los ensayos que miden los marcadores de la activación de las DC solas puede no ser suficiente para concluir sobre la presencia o la ausencia de potencial de sensibilización cutánea de los productos. Por consiguiente, se proponen los datos generados con los ensayos descritos en el presente método de ensayo como ayuda para discriminar entre los sensibilizantes cutáneos (es decir, la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) y los no sensibilizantes, cuando se utilicen en los enfoques integrados de ensayos y evaluación (IATA, *Integrated Approaches to Testing and Assessment*), junto con otros datos complementarios pertinentes derivados, por ejemplo, de ensayos *in vitro* relativos a otros fenómenos clave de la AOP de la sensibilización cutánea, así como métodos que no sean de ensayo, incluida la extrapolación a partir de análogos químicos (13). Se han publicado ejemplos de la utilización de los datos obtenidos con estos ensayos en enfoques definidos, es decir, enfoques normalizados tanto en relación con el conjunto de fuentes de información utilizadas como en el procedimiento aplicado a los datos para obtener asignaciones (13), y pueden emplearse como elementos útiles en el marco de los IATA.

8. Los ensayos descritos en este método de ensayo no pueden utilizarse solos, ni para clasificar los sensibilizantes cutáneos en las subcategorías 1A y 1B definidas por el SGA de las Naciones Unidas y el CLP, en el caso de las autoridades que apliquen estas dos subcategorías facultativas, ni para asignar la potencia a efectos de las decisiones de evaluación de la seguridad. Sin embargo, dependiendo del marco normativo, los resultados positivos generados con estos métodos pueden utilizarse por sí solos para clasificar un producto en la categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP.

▼M8

9. En este método de ensayo se utiliza el término «producto problema» para referirse a lo que se somete a ensayo ([1]), y no está relacionado con la aplicabilidad de los ensayos al estudio de sustancias de un solo componente, sustancias de componentes múltiples y/o mezclas. Actualmente, se dispone de información limitada sobre la aplicabilidad de los ensayos a las sustancias de componentes múltiples / mezclas (14) (15). Sin embargo, los ensayos son técnicamente aplicables a las sustancias de componentes múltiples y mezclas. No obstante, antes de la utilización de este método de ensayo con una mezcla para obtener datos con fines normativos, debe considerarse si podría proporcionar resultados adecuados a tal fin y, en caso afirmativo, por qué ([2]). Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos normativos estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo. Por otra parte, al ensayar sustancias de componentes múltiples o mezclas, deben tenerse en cuenta las posibles interferencias de componentes citotóxicos con las respuestas obtenidas.

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Naciones Unidas (2015). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Sexta edición revisada. Nueva York & Ginebra: Publicaciones de las Naciones Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible en: https://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/06files_s.html.

(2) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment No. 168. Disponible en: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En).

(3) Capítulo B.42 del presente anexo: Ensayo con ganglios linfáticos locales.

(4) Capítulo B.6 del presente anexo: Sensibilización de la piel.

(5) Capítulo B.50 del presente anexo: Sensibilización cutánea: Ensayo con ganglios linfáticos locales: DA.

(6) Capítulo B.51 del presente anexo: Sensibilización cutánea: Ensayo con ganglios linfáticos locales: BrdU-ELISA.

(7) Capítulo B.59 del presente anexo: Sensibilización cutánea *in chemico*: Ensayo directo de reactividad peptídica (DPRA).

(8) Capítulo B.60 del presente anexo: Sensibilización cutánea *in vitro*: Método de ensayo de la luciferasa ARE-Nrf2.

(9) Steinman RM. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Annu Rev Immunol 9:271-96.

(10) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, and Banchereau J. (1994). B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. J Exp Med 180:1841-7.

(11) Aiba S, Terunuma A, Manome H, and Tagami H. (1997). Dendritic cells differently respond to haptens and irritants by their production of cytokines and expression of co-stimulatory molecules. Eur J Immunol 27:3031-8.

([1]) En junio de 2013, la reunión conjunta de la OCDE acordó que, en la medida de lo posible, en las directrices de ensayo de la OCDE nuevas y actualizadas se debía respetar un uso más coherente del término «producto problema» para describir lo que se somete a ensayo.

([2]) Esta frase se propuso y se aprobó en la reunión del WNT de abril de 2014.

▼**M8**

(12) Aiba S, Manome H, Nakagawa S, Mollah ZU, Mizuashi M, Ohtani T, Yoshino Y, and Tagami. H. (2003). p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinases play distinct roles in the activation of dendritic cells by two representative haptens, NiCl2 and DNCB. J Invest Dermatol 120:390-8.

(13) OCDE (2016). Series on Testing & Assessment No 256: Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Annex 1 and Annex 2. ENV/JM/HA(2016)29. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: https://community.oecd.org/community/iatass.

(14) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(15) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

▼**M8**

*Apéndice 1*

SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA IN VITRO: ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR HUMANA (H-CLAT)

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

1. El ensayo h-CLAT cuantifica los cambios en la expresión de los marcadores de superficie celular asociados al proceso de activación de los monocitos y de las células dendríticas (DC) (es decir, CD86 y CD54), en la línea celular de la leucemia monocítica humana (THP-1), tras la exposición a sensibilizantes (1) (2). Los niveles de expresión medidos en los marcadores de superficie celular CD86 y CD54 se utilizan a continuación para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes.

2. El ensayo h-CLAT se ha evaluado en un estudio de validación coordinado por el laboratorio de referencia de la Unión Europea para las alternativas a los ensayos con animales (EURL ECVAM), con posterior revisión por pares independientes en el Comité Científico Consultivo del ECVAM (ESAC). Teniendo en cuenta todas las pruebas disponibles y las aportaciones de los reguladores y de las partes interesadas, el EURL ECVAM recomendó que el h-CLAT se utilizara como parte de un enfoque IATA para justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes a efectos de la clasificación de los peligros y el etiquetado (3). En la bibliografía se recogen ejemplos del uso de datos del h-CLAT en combinación con otra información (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

3. Se ha demostrado que el h-CLAT puede transferirse a laboratorios con experiencia en técnicas de cultivo celular y análisis de citometría de flujo. El nivel de reproducibilidad de las asignaciones que cabe esperar del ensayo es del orden del 80 % dentro de un laboratorio y entre laboratorios (3) (12). Los resultados obtenidos en el estudio de validación (13) y otros estudios publicados (14) indican en general que, en comparación con los resultados del LLNA, la exactitud de la distinción de los sensibilizantes cutáneos (es decir, categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) frente a los no sensibilizantes es del 85 % (N = 142), con una sensibilidad del 93 % (94/101) y una especificidad del 66 % (27/41) [sobre la base de un nuevo análisis por el EURL ECVAM (12), considerando todos los datos existentes y no teniendo en cuenta los resultados negativos correspondientes a productos con un valor de log Kow superior a 3,5, como se describe en el punto 4]. Es más probable que las asignaciones negativas falsas con el ensayo h-CLAT afecten a los productos que muestran una potencia de sensibilización cutánea baja o moderada (es decir, subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) que a los productos que presentan una potencia de sensibilización cutánea elevada (es decir, subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (4) (13) (15). En conjunto, esta información indica la utilidad del método del h-CLAT para contribuir a la identificación del peligro de sensibilización cutánea. Sin embargo, los valores de la exactitud aquí indicados para el h-CLAT utilizado como ensayo único solo son indicativos, ya que el ensayo debe considerarse en combinación con otras fuentes de información en el contexto de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 7 y 8 de la introducción general. Además, a la hora de evaluar los métodos de ensayo de la sensibilización cutánea sin animales, debe tenerse en cuenta que el ensayo LLNA y otros ensayos con animales pueden no reflejar plenamente la situación en los seres humanos.

4. Sobre la base de los datos actualmente disponibles, se ha demostrado que el h-CLAT es aplicable a productos problema que abarcan diversos grupos funcionales orgánicos, mecanismos de reacción, potencias de sensibilización cutánea (determinada en estudios *in vivo*) y propiedades fisicoquímicas (3) (14) (15). El método h-CLAT es aplicable a los productos problema solubles o que forman una dispersión estable (es decir, un coloide o una suspensión en la que el producto problema no sedimenta ni se separa del disolvente o vehículo para formar distintas fases) en un disolvente o vehículo adecuado (véase el punto 14). Los productos problema con un valor de log Kow superior a 3,5 tienden a producir resultados falsos negativos (14). Por tanto, no deben tenerse en cuenta los resultados negativos con productos problema cuyo valor de log Kow es superior a 3,5. Sin embargo, los resultados

▼M8

positivos obtenidos con productos problema cuyo valor de log Kow es superior a 3,5 podrían seguir utilizándose para justificar la identificación del producto problema como sensibilizante cutáneo. Por otra parte, debido a la limitada capacidad metabólica de la línea celular utilizada (16) y debido a las condiciones experimentales, pueden obtenerse también resultados negativos en el h-CLAT (15) con los pro-haptenos (es decir, sustancias que requieren activación enzimática, por ejemplo mediante enzimas P450) y los pre-haptenos (es decir, productos activados por oxidación), en particular con una baja velocidad de oxidación. Los productos problema fluorescentes pueden evaluarse con el h-CLAT (17); sin embargo, los productos problema muy fluorescentes que emiten a la misma longitud de onda que el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o que el yoduro de propidio (PI), pueden interferir con la detección por citometría de flujo y, por tanto, no pueden evaluarse correctamente utilizando anticuerpos conjugados con el FITC o PI. En tal caso, pueden utilizarse otros anticuerpos marcados con fluorocromos u otros marcadores de citotoxicidad, según corresponda, siempre que se demuestre que proporcionan resultados similares a los de los anticuerpos marcados con FITC (véase el punto 24) o PI (véase el punto 18), por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para la prueba de la competencia recogidas en el apéndice 1.2. A la luz de lo anterior, los resultados negativos deben interpretarse en el contexto de las limitaciones indicadas y junto con otras fuentes de información en el marco de los enfoques IATA. En los casos en que haya pruebas que demuestren la inaplicabilidad del método h-CLAT a otras categorías específicas de productos problema, no deberá utilizarse este método con tales categorías específicas.

5. Tal como se ha descrito anteriormente, el método h-CLAT sirve para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes. No obstante, puede contribuir también a la evaluación de la potencia sensibilizante (4) (5) (9) cuando se utiliza en enfoques integrados, como los enfoques IATA. Sin embargo, es necesario seguir trabajando, preferentemente a partir de datos con seres humanos, para determinar de qué modo los resultados del h-CLAT pueden informar sobre la evaluación de la potencia.

6. En el apéndice 1.1 se dan las definiciones pertinentes.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. El método h-CLAT es un ensayo *in vitro* que cuantifica los cambios de la expresión de los marcadores de superficie celular (es decir, CD86 y CD54) de la línea celular THP-1 de la leucemia monocítica humana, tras una exposición de 24 horas al producto problema. Estas moléculas de superficie son marcadores típicos de la activación de las células THP-1 monocíticas y pueden imitar la activación de las DC, la cual desempeña un papel fundamental en la estimulación de las células T. Los cambios en la expresión de los marcadores de superficie se miden mediante citometría de flujo tras la tinción celular mediante anticuerpos marcados con fluorocromo. También se lleva a cabo simultáneamente una medición de la citotoxicidad con el fin de evaluar si a concentraciones subcitotóxicas se produce un incremento de la expresión de los marcadores de superficie. Se calcula la intensidad de la fluorescencia relativa de los marcadores de superficie en comparación con el control del disolvente o de vehículo y se utiliza en el modelo de asignación (véase el punto 26), a fin de justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes.

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

8. Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método de ensayo B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias recomendadas al efecto en el apéndice 1.2. Por otra parte, los usuarios del ensayo deben mantener una base de datos históricos que contenga los generados en los controles de reactividad (véase el punto 11) y con los testigos positivos y el control del disolvente/vehículo (véanse los puntos 20 a 22), y utilizar estos datos para confirmar que la reproducibilidad del ensayo en su laboratorio se mantiene a lo largo del tiempo.

▼M8

PROCEDIMIENTO

9. Este ensayo se basa en el protocolo n.º 158 de servicio de la base de datos de h-CLAT sobre métodos alternativos a la experimentación con animales (DB-ALM) (18) que constituye el protocolo utilizado para el estudio de validación coordinado por el EURL ECVAM. Se recomienda que se siga este protocolo cuando se aplique y utilice el método h-CLAT en el laboratorio. A continuación se recoge una descripción de los principales componentes y procedimientos del método h-CLAT, que comprende dos etapas: *ensayo de determinación de la dosis y medición de la expresión de los marcadores CD86/CD54.*

**Preparación de las células**

10. Para llevar a cabo el método h-CLAT debe utilizarse la línea celular de la leucemia monocítica humana, THP-1. Se recomienda que las células (TIB-202™) se obtengan de un banco de células adecuado, como la American Type Culture Collection.

11. Se cultivan células THP-1, a 37ºC, en atmósfera humidificada y con un 5 % de $CO_2$, en medio RPMI-1640, complementado con un 10 % de suero bovino fetal (FBS), 2-mercaptoetanol 0,05 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Puede evitarse el uso de penicilina y de estreptomicina en el medio de cultivo. Sin embargo, en tal caso, los usuarios deben verificar que la ausencia de antibióticos en el medio de cultivo no influye en los resultados, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia que figuran en el apéndice 1.2. En cualquier caso, para minimizar el riesgo de contaminación, deben seguirse buenas prácticas de cultivo celular, independientemente de la presencia o no de antibióticos en el medio de cultivo celular. Las células THP-1 se siembran sistemáticamente cada 2-3 días a una densidad de 0,1 a 0,2 × $10^6$ células/ml. Deben mantenerse a densidades de 0,1 a 1,0 × $10^6$ células/ml. Antes de utilizarse para el ensayo, las células deben ser objeto de un control de reactividad, que ha de realizarse utilizando los testigos positivos, 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB) (n.º CAS 97-00-7, pureza ≥ 99 %) y sulfato de níquel ($NiSO_4$) (n.º CAS 10101-97-0, pureza ≥ 99 %) y el testigo negativo, ácido láctico (LA) (n.º CAS 50-21-5, pureza ≥ 85 %), dos semanas después de la descongelación. Tanto el DNCB como el $NiSO_4$ deben producir una respuesta positiva de los marcadores de superficie celular CD86 y CD54, y el LA debe producir una respuesta negativa de ambos tipos de marcadores. Solo se pueden utilizar para el ensayo las células que hayan superado el control de reactividad. Las células pueden propagarse hasta dos meses después de la descongelación. El número de pases no debe ser superior a 30. El control de reactividad debe realizarse con arreglo a los procedimientos descritos en los puntos 20 a 24.

12. Para el ensayo, se siembran células THP-1 a una densidad de 0,1 × $10^6$ células/ml o 0,2 × $10^6$ células/ml, y se precultivan en matraces de cultivo durante 72 horas o durante 48 horas, respectivamente. Es importante que la densidad celular en el matraz de cultivo justo después del período de precultivo sea lo más constante posible en cada experimento (utilizando una de las dos condiciones de precultivo descritas anteriormente), ya que la densidad celular en el matraz de cultivo justo después del precultivo podría afectar a la expresión de CD86/CD54 inducida por alérgenos (19). En el día del ensayo, se toman células del matraz de cultivo y se suspenden con medio de cultivo fresco a la concentración de 2 × $10^6$ células/ml. A continuación, se distribuyen las células en una placa de fondo plano de 24 pocillos (500 µl, 1 × $10^6$ células/pocillo) o una placa de fondo plano de 96 pocillos (80 µl, 1,6 × $10^5$ células/pocillo).

**Ensayo de determinación de la dosis**

13. Se lleva a cabo un *ensayo de determinación de la dosis* para determinar la CV75, que es la concentración del producto problema que da el 75 % de viabilidad celular (CV) en comparación con el control del disolvente/vehículo. El valor de CV75 se utiliza para determinar la concentración de productos problema utilizada en la medición de la expresión de *CD86/CD54* (véanse los puntos 20-24).

▼**M8**

*Preparación de los productos problema y de las sustancias testigo*

14. Los productos problema y las sustancias testigo se preparan el día del ensayo. Para el método h-CLAT, los productos problema se disuelven o dispersan de forma estable (véase también el punto 4) en solución salina o medio, como primeras opciones de disolvente/vehículo, o en dimetilsulfóxido (DMSO, ≥ 99 % de pureza) como segunda opción de disolvente/vehículo si el producto problema no es soluble o no forma una dispersión estable en los dos disolventes/vehículos anteriores, hasta obtener las concentraciones finales de 100 mg/ml (en solución salina o medio) o 500 mg/ml (en DMSO). Podrán utilizarse otros disolventes/vehículos distintos de los descritos anteriormente si se presenta una justificación científica suficiente. Debe tenerse en cuenta la estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo final.

15. A partir de las soluciones madre de 100 mg/ml (en solución salina o en medio) o 500 mg/ml (en DMSO) de los productos problema, deben efectuarse las siguientes diluciones:

— Con solución salina o medio como disolvente/vehículo: Se preparan ocho soluciones madre (ocho concentraciones), mediante diluciones a la mitad en serie utilizando el disolvente o vehículo correspondiente. Estas soluciones madre se diluyen posteriormente 50 veces en medio de cultivo (soluciones de trabajo). Si la concentración final máxima en la placa de 1 000 μg/ml no es tóxica, debe volver a determinarse la concentración máxima realizando un nuevo ensayo de citotoxicidad. La concentración final en la placa no debe exceder de 5 000 μg/ml en el caso de los productos problema disueltos o dispersos de forma estable en la solución salina o salina.

— Con DMSO como disolvente/vehículo: Se preparan ocho soluciones madre (ocho concentraciones), mediante diluciones a la mitad en serie utilizando el disolvente o vehículo correspondiente. Estas soluciones madre se diluyen posteriormente 250 veces en medio de cultivo (soluciones de trabajo). la concentración final en la placa no debe exceder de 1 000 μg/ml, incluso aunque esta concentración no sea tóxica.

Las soluciones de trabajo se utilizan finalmente para la exposición añadiendo un volumen igual de solución de trabajo al volumen de la suspensión de células THP-1 en la placa (véase también el punto 17) para lograr otra dilución a la mitad (normalmente, el intervalo final de concentraciones en la placa es de 7,81-1 000 μg/ml).

16. El control del disolvente o vehículo utilizado en el método h-CLAT es el medio de cultivo [en el caso de los productos problema disueltos o dispersos de forma estable (véase el punto 4), con medio o con solución salina] o el DMSO (en el caso de los productos problema disueltos o dispersos de forma estable en DMSO), y se somete a ensayo a una única concentración final en la placa del 0,2 %. Se somete al mismo proceso de dilución que se describe en el punto 15 para las soluciones de trabajo.

*Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo*

17. El medio de cultivo o las soluciones de trabajo descritas en los puntos 15 y 16 se mezclan 1: 1 (v/v) con las suspensiones celulares preparadas en la placa de fondo plano de 24 pocillos o de 96 pocillos (véase el punto 12). A continuación, las placas tratadas se incuban durante 24 ± 0,5 horas a 37°C con 5 % de $CO_2$. Deben tomarse precauciones para evitar la evaporación de los productos problema volátiles y la contaminación cruzada entre pocillos por productos problema, por ejemplo tapando la placa antes de la incubación con los productos problema (20).

▼**M8**

*Tinción con yoduro de propidio (PI)*

18. Tras 24 ± 0,5 horas de exposición, las células se transfieren a tubos de muestreo y se recogen por centrifugación. Los sobrenadantes se desechan y las células restantes se vuelven a suspender con 200 µl (en caso de 96 pocillos) o 600 µl (en caso de 24 pocillos) de una solución salina amortiguadora de fosfato que contenga un 0,1 % de seroalbúmina bovina (solución amortiguadora de tinción). Se transfieren 200 µl de suspensión celular a una placa de fondo redondo de 96 pocillos (en caso de 96 pocillos) o a un microtubo (en el caso de 24 pocillos) y se lavan dos veces con 200 µl (en caso de 96 pocillos) o 600 µl (en caso de 24 pocillos) de solución amortiguadora de tinción. Por último, las células se vuelven a suspender en solución amortiguadora de tinción (p. ej., 400 µl) y se añade la solución de PI (p. ej., 20 µl) (p. ej., la concentración final de PI es de 0,625 µg/ml). Pueden utilizarse otros marcadores de citotoxicidad, tales como la 7-aminoactinomicina D (7-AAD), azul tripano u otros, si se puede demostrar que las tinciones alternativas ofrecen resultados similares a los del PI, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia que figuran en el apéndice 1.2.

*Medición de la citotoxicidad por citometría de flujo y estimación del valor de CV75*

19. La absorción del PI se analiza mediante citometría de flujo con el canal de medición FL-3. Se miden en total 10 000 células vivas (negativas para el PI). La viabilidad celular puede calcularse con la siguiente ecuación por el programa de análisis del citómetro. Cuando la viabilidad celular es baja, deben medirse hasta 30 000 células, incluidas las células muertas. Como alternativa, también es posible medir los datos durante un minuto tras el inicio del análisis.

$$Viabilidad\ celular = \frac{Número\ de\ células\ vivas}{Número\ total\ de\ células\ adquiridas} \times 100$$

El valor de CV75 (véase el punto 13), es decir, la concentración que muestra el 75 % de supervivencia de las células THP-1 (25 % de citotoxicidad), se calcula mediante interpolación semilogarítmica con la siguiente ecuación:

$$Lg\ CV75 = \frac{(75 - c) \times Lg(b) - (75 - a) \times Lg(d)}{a - c}$$

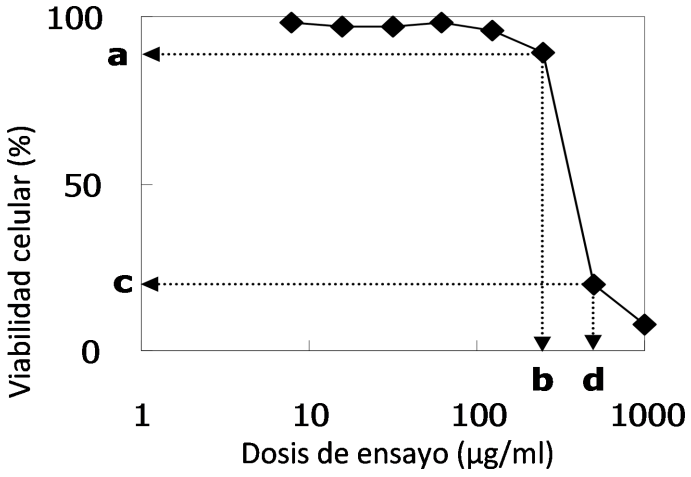
donde:

a es el valor mínimo de viabilidad celular superior al 75 %;

c es el valor máximo de viabilidad celular inferior al 75 %;

b y d son las concentraciones que muestran los valores de viabilidad celular a y c, respectivamente.

▼M8




Pueden utilizarse otros métodos para obtener el valor de CV75 siempre que se demuestre que esto no afecta a los resultados (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia).

**Medición de la expresión de CD86/CD54**

*Preparación de los productos problema y de las sustancias testigo*

20. El disolvente o vehículo apropiado (solución salina, medio o DMSO; véase el punto 14). Los productos problema se diluyen primero a la concentración correspondiente a 100 veces (en caso de solución salina) o 500 veces (en caso de DMSO) la concentración 1,2 × CV75 determinada en el *ensayo de determinación de la dosis* (véase el punto 19). Si no puede determinarse la CV75 (es decir, si no se observa suficiente citotoxicidad en el *ensayo de determinación de la dosis*), debe utilizarse como concentración inicial la concentración más elevada soluble o dispersa de forma estable del producto problema preparado con cada disolvente o vehículo. Téngase en cuenta que la concentración final en la placa no debe superar los 5 000 µg/ml (en el caso de la solución salina o del medio) o los 1 000 µg/ml (en el caso del DMSO). A continuación, se utilizan diluciones en serie de factor 1,2 con el disolvente o vehículo correspondiente para obtener las soluciones madre [ocho concentraciones comprendidas entre 100 × 1,2 × CV75 y 100 × 0,335 × CV75 (con solución salina o medio) o entre 500 × 1,2 × CV75 y 500 × 0,335 × CV75 (con DMSO)] que deben someterse a ensayo con el método h-CLAT (véase en el protocolo DB-ALM, n.º 158 un ejemplo de sistema de dosificación). Las soluciones madre se diluyen posteriormente 50 veces (en caso de solución salina o medio) o 250 veces (en caso de DMSO) en el medio de cultivo (soluciones de trabajo). Estas soluciones de trabajo se utilizan finalmente para la exposición con otra dilución final a la mitad en la placa. Si los resultados no cumplen los criterios de aceptación descritos en los puntos 29 y 30 respecto a la viabilidad celular, podrá repetirse el *ensayo de determinación de la dosis* para determinar el valor de CV75 más precisamente. Téngase en cuenta que para la medición de la expresión de CD86/CD54 se pueden utilizar solo placas de 24 pocillos.

21. El control del disolvente/vehículo se prepara como se describe en el punto 16. El testigo positivo utilizado en el método h-CLAT es el DNCB (véase el punto 11); se preparan las soluciones madre en DMSO y se diluyen como se describe en el punto 20 respecto a las soluciones madre. El DNCB debe utilizarse como testigo positivo para la *medición de la expresión de CD86/CD54* en una única concentración final en la placa (por lo general, 4,0 µg/ml). Para obtener una concentración de 4,0 µg/ml de DNCB en la placa, se prepara una solución madre de 2 mg/ml de DNCB en DMSO, y se diluye después 250 veces con medio de cultivo hasta conseguir una solución

▼M8

de trabajo de 8 µg/ml. Alternativamente, la CV75 del DNCB, que se determina en cada laboratorio, también podría utilizarse como concentración de testigo positivo. Podrán utilizarse otros testigos positivos adecuados si se dispone de datos históricos para obtener criterios comparables de aceptación de tandas. Respecto a los testigos positivos, la concentración final única en la placa no debe superar los 5 000 µg/ml (en el caso de la solución salina o del medio) o los 1 000 µg/ml (en el caso del DMSO). Los criterios de aceptación de tandas son los mismos que los descritos para el producto problema (véase el punto 29), excepto en lo relativo al último criterio de aceptación, puesto que el testigo positivo se somete a ensayo a una sola concentración.

*Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo*

22. Respecto a cada producto problema y sustancia testigo, se necesita un solo experimento para obtener una asignación. Cada experimento consiste en al menos dos tandas independientes para la *medición de la expresión de CD86/CD54* (véanse los puntos 26-28). Cada tanda independiente se llevará a cabo en un día diferente o el mismo día, siempre que, respecto a cada una de las tandas: a) se preparen soluciones madre y soluciones de trabajo nuevas e independientes del producto problema y de los anticuerpos, y b) se utilicen células recolectadas de forma independiente (es decir, se recogen las células de distintos matraces de cultivo); no obstante, las células pueden proceder del mismo pase. Los productos problema y las sustancias testigo preparados como soluciones de trabajo (500 µl) se mezclan con 500 µl de células suspendidas (1 x $10^6$ células) en la proporción 1: 1, y las células se incuban durante 24 ± 0,5 horas, como se describe en los puntos 20 y 21. En cada tanda, bastará una sola réplica de cada concentración del producto problema y de la sustancia testigo, ya que la clasificación se obtiene de al menos dos tandas independientes.

*Tinción y análisis celular*

23. Después de 24 ± 0,5 horas de exposición, se transfieren las células de la placa de 24 pocillos a los tubos de muestreo, se recogen por centrifugación y, a continuación, se lavan dos veces con 1 ml de solución amortiguadora de tinción (en caso necesario, pueden aplicarse más etapas de lavado). Tras su lavado, las células se bloquean con 600 µl de solución de bloqueo [solución amortiguadora de tinción con 0,01 % (p/v) de globulina (fracciones II y III de Cohn, humanas; SIGMA, # G2388-10G o equivalente)] y se incuban a 4°C durante 15 min. Tras su bloqueo, las células se dividen en tres alícuotas de 180 µl en una placa de fondo redondo de 96 pocillos o microtubo.

24. Tras su centrifugación, las células se tiñen con 50 µl de anticuerpos anti-CD86, anti-CD54 marcados con FITC o IgG1 (isotipo) de ratón a 4°C durante 30 min. Los anticuerpos descritos en el protocolo n.º 158 de la DB-ALM de h-CLAT (18) deben utilizarse mediante dilución 3: 25 v/v [para CD86 (BD-PharMingen, # 5556 57; Clone: Fun-1)] o 3: 50 v/v [para CD54 (DAKO, #F7143; Clone: 6.5B5) e IgG1 (DAKO, #X0927)] con solución amortiguadora de tinción. Los desarrolladores del ensayo definieron estos factores de dilución de los anticuerpos como los que proporcionan la mejor relación entre señal y ruido. Según la experiencia de los desarrolladores del ensayo, la intensidad de la fluorescencia de los anticuerpos suele ser coherente entre los diferentes lotes. No obstante, los usuarios pueden considerar la valoración de los anticuerpos en las condiciones de su propio laboratorio a fin de determinar las mejores concentraciones que han de utilizar. Podrán utilizarse otros anticuerpos marcados con fluorocromo antiCD86 y/o antiCD54 si se puede demostrar que proporcionan resultados similares a los de anticuerpos conjugados con FITC, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para demostrar la competencia que se indican en el apéndice 1.2. Cabe señalar que la modificación del clon o del proveedor de los anticuerpos, tal como se recogen en el protocolo DB-ALM n.º 158 del h-CLAT (18), puede afectar a los resultados. Después de lavarlas dos veces o más con 150 µl de solución amortiguadora de tinción, las células se vuelven a suspender en esta solución amortiguadora de tinción (p ej., 400 µl) y en .la

▼M8

solución de PI (p. ej., 20 µl para obtener una concentración final de 0,625 µg/ml) o en la solución de otro marcador de citotoxicidad (véase el punto 18). Se analizan los niveles de expresión de CD86 y CD54, y la viabilidad celular, utilizando la citometría de flujo.

DATOS E INFORME

**Evaluación de los datos**

25. La expresión de CD86 y CD54 se analiza mediante citometría de flujo con el canal de medida FL-1. Sobre la base de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia (MFI, *mean fluorescence intensity*), la intensidad de la fluorescencia relativa (RFI, *relative fluorescence intensity*) de CD86 y CD54 en el caso de las células testigo positivo (ctrl) y de las células tratadas con producto se calcula con arreglo a la ecuación siguiente:

$$RFI = \frac{MFI\ células\ tratadas\ producto - MFI\ células\ testigo\ isotipo\ tratadas\ producto}{MFI\ células\ ctrl\ tratadas\ disolvente/vehículo - MFI\ células\ ctrl\ isotipo\ tratadas\ disolvente/vehículo} \times 100$$

La viabilidad celular de las células testigo de isotipo (ctrl) [que se tiñen con anticuerpos IgG1 (isotipo) de ratón] se calcula también con arreglo a la ecuación descrita en el punto 19.

**Modelo de asignación**

26. Para la medición de la expresión de *CD86/CD54*, cada producto problema se somete al menos a dos tandas independientes a fin de obtener una única asignación (POSITIVA o NEGATIVA). La asignación del h-CLAT se considera POSITIVA si en 2 de 2, o en al menos 2 de 3, tandas independientes se cumple al menos una de las condiciones siguientes; de lo contrario, la asignación del h-CLAT se considera NEGATIVA (figura 1):

— La RFI del CD86 es igual o superior al 150 % a cualquier concentración estudiada (con viabilidad celular ≥ 50 %);

— La RFI del CD54 es igual o superior al 200 % a cualquier concentración estudiada (con viabilidad celular ≥ 50 %);

27. Sobre la base de lo anterior, si las dos primeras tandas son positivas para el CD86 y/o son positivas para el CD54, la asignación del h-CLAT se considera POSITIVA y no es necesario realizar una tercera tanda. Del mismo modo, si las dos primeras tandas son negativas para ambos marcadores, la asignación del h-CLAT se considera NEGATIVA (teniendo debidamente en cuenta lo dispuesto en el punto 30) sin necesidad de una tercera tanda. Sin embargo, si las dos primeras tandas no son concordantes en relación al menos con uno de los marcadores (CD54 o CD86), se necesita una tercera tanda y la asignación final se basará en el resultado mayoritario de las tres tandas individuales (es decir, 2 de 3). A este respecto, hay que señalar que, si se llevan a cabo dos tandas independientes y una es solo positiva en el caso del CD86 (en lo sucesivo, $P_1$) y la otro es solo positiva en el caso del CD54 (en lo sucesivo $P_2$), se requiere una tercera tanda. Si esta tercera tanda es negativa para ambos marcadores (en lo sucesivo, N), la asignación del h-CLAT se considera NEGATIVA. Por otra parte, si la tercera tanda es positiva para uno de los dos marcadores ($P_1$ o $P_2$) o para ambos marcadores (en lo sucesivo, $P_{12}$), la asignación del h-CLAT se considera POSITIVA.

▼**M8**

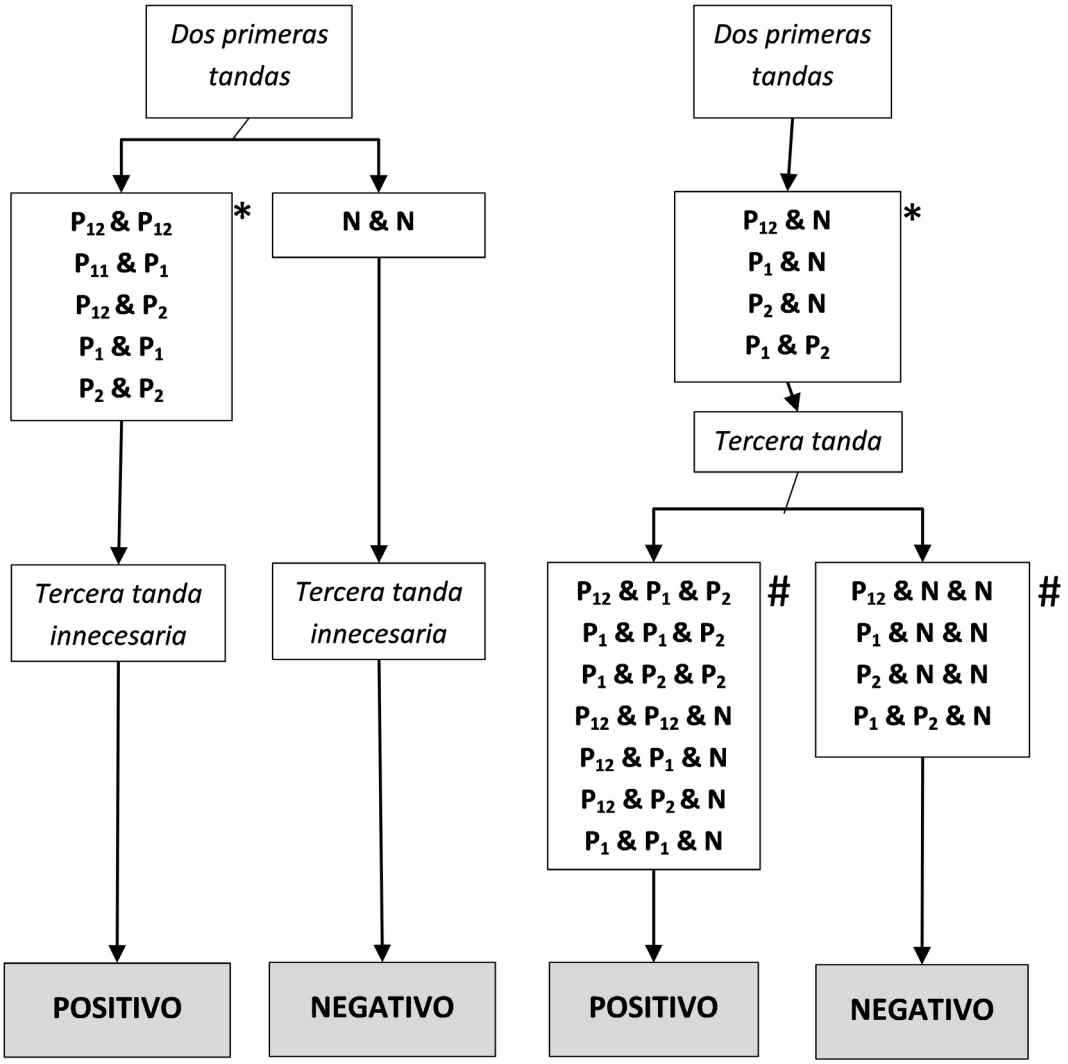



**Figura 1** Modelo de asignación utilizado en el método h-CLAT. Las asignaciones del h-CLAT deben interpretarse en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 7 y 8 de la introducción general.

$P_1$: tanda con solo CD86 positivo; $P_2$: tanda con solo CD54 positivo; $P_{12}$: tanda con CD86 y CD54 positivos; N: tanda sin CD86 ni CD54 positivos.

* Los recuadros muestran las combinaciones pertinentes de resultados de las dos primeras tandas, con independencia del orden en que puedan obtenerse.

# Los recuadros muestran las combinaciones pertinentes de resultados de las tres tandas sobre la base de los resultados obtenidos en las dos primeras, indicadas en el recuadro superior, pero no reflejan el orden en que puedan obtenerse.

28. En el caso de los productos problema clasificados como POSITIVOS con el h-CLAT, opcionalmente se pueden determinar dos valores de concentraciones efectivas (CE), el valor de CE150 para el CD86 y el valor de CE200 para el CD54, es decir, la concentración a la que los productos problema inducen una RFI de 150 o de 200. Estos valores de CE podrían contribuir a la evaluación de la potencia sensibilizante (9) cuando se utilicen en enfoques integrados, como los enfoques IATA (4) (5) (6) (7) (8). Pueden calcularse con las siguientes ecuaciones:

▼**M8**

$$EC\ 150\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(150 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

$$EC\ 200\ (for\ CD86) = B_{conc} + [(200 - B_{RFI})/A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{conc} - B_{conc})]$$

donde:

$A_{conc}$ es la concentración más baja, en µg/ml, con RFI > 150 (CD86) o 200 (CD54);

$B_{conc}$ es la concentración más alta, en µg/ml, con RFI < 150 (CD86) o 200 (CD54);

$A_{RFI}$ es la RFI a la concentración más baja con RFI > 150 (CD86) o 200 (CD54);

$B_{RFI}$ es la RFI a la concentración más alta con RFI < 150 (CD86) o 200 (CD54).

Con el fin de obtener más precisamente los valores de CE150 y CE200, pueden ser necesarias tres tandas independientes para la *medición de la expresión de CD86/CD54*. Los valores finales de CE150 y CE200 se determinan a continuación como el valor mediano de las CE calculadas con las tres tandas independientes. Si solo dos de las tres tandas independientes cumplen los criterios de positividad (véanse los puntos 26 - 27), se adopta el valor de CE150 o CE200 más alto de los dos valores calculados.

**Criterios de aceptación**

29. Cuando se use el método h-CLAT deben cumplirse los siguientes criterios de aceptación (22) (27).

— Las viabilidades celulares de los controles de disolvente o vehículo y medio deben ser superiores al 90 %.

— En el control del disolvente o vehículo, los valores de RFI tanto del CD86 como del CD54 no deben superar los criterios positivos (CD86 con RFI ≥ 150 % y CD54 con RFI ≥ 200 %). Los valores de RFI del control del disolvente o vehículo se calculan mediante la fórmula descrita en el punto 25 [MFI del producto debe sustituirse por MFI del disolvente/vehículo y MFI del disolvente/vehículo debe sustituirse por MFI del control (medio)].

— Tanto en los controles de medio como en los de disolvente o vehículo, la proporción de la MFI tanto del CD86 como del CD54 respecto a la del testigo de isotipo deberá ser > 105 %.

— En el testigo positivo (DNCB), los valores de RFI tanto del CD86 como del CD54 deben cumplir los criterios positivos (CD86 con RFI ≥ 150 y CD54 con RFI ≥ 200) y la viabilidad celular debe ser superior al 50 %.

— En el caso del producto problema, la viabilidad celular debe ser superior al 50 % en al menos cuatro concentraciones sometidas a ensayo en cada tanda.

30. Los resultados negativos son aceptables únicamente para los productos problema que presenten una viabilidad celular inferior al 90 % en la concentración más alta ensayada (es decir, 1,2 × CV75 según el sistema de diluciones en serie descrito en el punto 20). Si la viabilidad celular a 1,2 × CV75 es igual o superior al 90 %, debe descartarse el resultado negativo. En tal caso, se recomienda intentar afinar la selección de la dosis repitiendo la determinación de la CV75. Hay que señalar que, cuando se utiliza como concentración máxima de ensayo de un producto problema la concentración de 5 000 µg/ml en solución salina (o en medio o en otros disolventes/vehículos), la de 1 000 µg/ml en DMSO o la mayor concentración soluble, se puede aceptar un resultado negativo aunque la viabilidad celular sea superior al 90 %.

▼M8

**Informe del ensayo**

31. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema*

Sustancias de un solo componente

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Aspecto físico, log Kow, hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas

— Caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), en la medida de lo posible;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

— Peso molecular o peso molecular aparente en el caso de mezclas/polímeros de composición conocida u otra información pertinente para la realización del estudio;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

*Testigos y controles*

Testigo positivo

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Aspecto físico, log $K_{ow}$, hidrosolubilidad, solubilidad en DMSO, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible y en los casos aplicables;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

▼**M8**

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Referencia a los resultados de los testigos positivos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación de las tandas, si procede.

Testigo negativo y controles del disolvente o vehículo

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Aspecto físico, peso molecular, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales en el caso de que se utilicen unos controles de disolvente o vehículo distintos de los especificados en las directrices del ensayo y en la medida de lo posible;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

*Condiciones del ensayo*

— Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;

— Descripción del ensayo utilizado;

— Línea celular utilizada, sus condiciones de conservación y su origen (por ejemplo, instalación en la que se ha obtenido);

— Citometría de flujo utilizada (por ejemplo, modelo), incluidos los ajustes instrumentales, la globulina, los anticuerpos y el marcador de citotoxicidad utilizados;

— Procedimiento utilizado para demostrar la competencia del laboratorio en la realización del ensayo mediante el ensayo de sustancias destinadas a tal fin, y procedimiento utilizado para demostrar que el ensayo tiene un comportamiento reproducible a lo largo del tiempo, por ejemplo datos de testigos históricos o datos históricos de controles de la reactividad.

*Criterios de aceptación del ensayo*

— Valores de viabilidad celular, de MFI y de RFI obtenidos con el control del disolvente o vehículo en comparación con los intervalos de aceptación;

— Valores de viabilidad celular y de RFI obtenidos con el testigo positivo en comparación con los intervalos de aceptación;

— Viabilidad celular de todas las concentraciones sometidas a ensayo del producto problema.

▼**M8**

*Procedimiento de ensayo*

— Número de tandas utilizadas;

— Concentraciones del producto problema, tiempo de aplicación y de exposición utilizado (si es diferente del recomendado);

— Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo.

*Resultados*

— Tabulación de los datos, incluidos la CV75 (si procede), los distintos valores de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia, de la RFI y de la viabilidad celular, los valores de CE150/CE200 (si procede) obtenidos con el producto problema y con el testigo positivo en cada tanda, y una indicación de la calificación del producto problema según el modelo de asignación;

— Descripción de cualesquiera otras observaciones pertinentes, si procede.

*Discusión de los resultados*

— Discusión de los resultados obtenidos con el método h-CLAT;

— Consideración de los resultados del ensayo en el contexto de un enfoque IATA, si se dispone de otra información pertinente.

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Ashikaga T, Yoshida Y, Hirota M, Yoneyama K, Itagaki H, Sakaguchi H, Miyazawa M, Ito Y, Suzuki H, Toyoda H. (2006). Development of an *in vitro* skin sensitization test using human cell lines: The human Cell Line Activation Test (h-CLAT) I. Optimization of the h-CLAT protocol. Toxicol. *In Vitro* 20, 767-773.

(2) Miyazawa M, Ito Y, Yoshida Y, Sakaguchi H, Suzuki H. (2007). Phenotypic alterations and cytokine production in THP-1 cells in response to allergens. Toxicol. *In Vitro* 21, 428-437.

(3) EC EURL-ECVAM (2013). Recommendation on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for skin sensitisation testing. Puede consultarse en: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(4) Takenouchi O, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Hirota M, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Test battery with the human cell line activation test, direct peptide reactivity assay and DEREK based on a 139 chemical data set for predicting skin sensitizing potential and potency of chemicals. J Appl Toxicol. 35, 1318-1332.

(5) Hirota M, Fukui S, Okamoto K, Kurotani S, Imai N, Fujishiro M, Kyotani D, Kato Y, Kasahara T, Fujita M, Toyoda A, Sekiya D, Watanabe S, Seto H, Takenouchi O, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Evaluation of combinations of *in vitro* sensitization test descriptors for the artificial neural network-based risk assessment model of skin sensitization. J Appl Toxicol. 35, 1333-1347.

(6) Bauch C, Kolle SN, Ramirez T, Fabian E, Mehling A, Teubner W, van Ravenzwaay B, Landsiedel R. (2012). Putting the parts together: combining *in vitro* methods to test for skin sensitizing potencials. Regul Toxicol Parmacol. 63, 489-504.

▼**M8**

(7) Van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natch A, van Loveren H, Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol. 69, 371-379.

(8) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, Natsch A, Emter R, Ashikaga T, Miyazawa M, Sakaguchi H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Parmacol. 71, 337-351.

(9) Jaworska JS, Natsch A, Ryan C, Strickland J, Ashikaga T, Miyazawa M. (2015). Bayesian integrated testing strategy (ITS) for skin sensitization potency assessment: a decision support system for quantitative weight of evidence and adaptive testing strategy. Arch Toxicol. 89, 2355-2383.

(10) Strickland J, Zang Q, Kleinstreuer N, Paris M, Lehmann DM, Choksi N, Matheson J, Jacobs A, Lowit A, Allen D, Casey W. (2016). Integrated decision strategies for skin sensitization hazard. J Appl Toxicol. DOI 10.1002/jat.3281.

(11) Nukada Y, Ashikaga T, Miyazawa M, Hirota M, Sakaguchi H, Sasa H, Nishiyama N. (2012). Prediction of skin sensitization potency of chemicals by human Cell Line Activation Test (h-CLAT) and an attempt at classifying skin sensitization potency. Toxicol. *In Vitro* 26, 1150-60.

(12) EC EURL ECVAM (2015). Re-analysis of the within and between laboratory reproducibility of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT). Puede consultarse en: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-human-cell-line-activation-test-h-clat-for-skin-sensitisation-testing

(13) EC EURL ECVAM (2012). human Cell Line Activation Test (h-CLAT) Validation Study Report Accessible at: https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations

(14) Takenouchi O, Miyazawa M, Saito K, Ashikaga T, Sakaguchi H. (2013). Predictive performance of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for lipophilic with high octanol-water partition coefficients. J. Toxicol. Sci. 38, 599-609.

(15) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, NishiyamaN, Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Altern. Lab. Anim. 38, 275-284.

(16) Fabian E., Vogel D., Blatz V., Ramirez T., Kolle S., Eltze T., van Ravenzwaay B., Oesch F., Landsiedel R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. Arch Toxicol 87, 1683-1969.

(17) Okamoto K, Kato Y, Kosaka N, Mizuno M, Inaba H, Sono S, Ashikaga T, Nakamura T, Okamoto Y, Sakaguchi H, Kishi M, Kuwahara H, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential ($6^{th}$ report): A study for evaluating oxidative hair dye sensitization potential using h-CLAT. AATEX 15, 81-88.

(18) DB-ALM (INVITTOX) (2014). Protocol 158: human Cell Line Activation Test (h-CLAT), 23pp. Puede consultarse en: http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/

▼**M8**

(19) Mizuno M, Yoshida M, Kodama T, Kosaka N, Okamato K, Sono S, Yamada T, Hasegawa S, Ashikaga T, Kuwahara H, Sakaguchi H, Sato J, Ota N, Okamoto Y, Ohno Y. (2008). Effects of pre-culture conditions on the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) results; Results of the 4th Japanese inter-laboratory study. AATEX 13, 70-82.

(20) Sono S, Mizuno M, Kosaka N, Okamoto K, Kato Y, Inaba H, Nakamura T, Kishi M, Kuwahara H, Sakaguchi H, Okamoto Y, Ashikaga T, Ohno Y. (2010). The Japanese ring study of a human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for predicting skin sensitization potential (7th report): Evaluation of volatile, poorly soluble fragrance materials. AATEX 15, 89-96.

(21) OCDE (2005). Guidance Document No 34 on The Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Series on Testing and Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París (Francia), 2005, 96 pp.

(22) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Series on Testing and Assessment, No. 168. Disponible en: http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(201210/PART1&docLanguage=En)

(23) Naciones Unidas (2013). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Quinta edición revisada. Nueva York & Ginebra: Publicaciones de las Naciones Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html

(24) ECETOC (2003). Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals (Technical Report No 87).

(25) Ashikaga T, Sakaguchi H, Okamoto K, Mizuno M, Sato J, Yamada T, Yoshida M, Ota N, Hasegawa S, Kodama T, Okamoto Y, Kuwahara H, Kosaka N, Sono S, Ohno Y. (2008). Assessment of the human Cell Line Activation Test (h-CLAT) for Skin Sensitization; Results of the First Japanese Inter-laboratory Study. AATEX 13, 27-35.

▼**M8**

*Apéndice 1.1*

DEFINICIONES

**Exactitud:** Grado de coincidencia entre los resultados del ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de concordancia se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un ensayo (21).

**Ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*):** Secuencia de fenómenos desde la estructura química de un producto diana o grupo de productos similares, pasando por el fenómeno molecular desencadenante, hasta un resultado *in vivo* de interés (22).

**Producto:** Sustancia o mezcla.

**CV75:** La concentración estimada que muestra una viabilidad celular del 75 %.

**CE150:** Concentraciones que muestran un valor de RFI de 150 en la expresión del CD86.

**CE200:** Concentraciones que muestran un valor de RFI de 200 en la expresión del CD54.

**Citometría de flujo:** Técnica de citometría en la que las células suspendidas en un fluido fluyen una a una a través de un foco de luz excitadora, que se dispersa en patrones característicos según las células y sus componentes; las células están marcadas frecuentemente con marcadores fluorescentes, de modo que la luz se absorbe primero y, a continuación, se emite con una frecuencia modificada.

**Peligro:** Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**IATA (Enfoque integrado de pruebas y evaluación, *Integrated Approach to Testing and Assessment*):** Enfoque estructurado para la identificación del peligro (potencial), caracterización del peligro (potencia) o evaluación de la seguridad (potencial/potencia y exposición) de un producto o grupo de productos, que integra y pondera de forma estratégica todos los datos pertinentes para fundamentar una decisión normativa relativa a posibles peligros o riesgos o a la necesidad de realizar ensayos más específicos y, por tanto, mínimos.

**Control del medio:** Réplica no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo. Esta muestra se somete al mismo proceso que las muestras tratadas con producto problema y otras muestras de control para determinar si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Mezcla:** Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

**Sustancias de un solo componente:** Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**Sustancia de componentes múltiples:** Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración $\geq$ 10 % (p/p) y $<$ 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

▼**M8**

**Testigo positivo:** Réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Pre-haptenos:** Productos que pasan a ser sensibilizantes por una transformación abiótica.

**Pro-haptenos:** Productos que requieren activación enzimática para ejercer su potencial de sensibilización cutánea.

**Intensidad de fluorescencia relativa (RFI):** Valores relativos de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia (MFI) de las células tratadas con el producto en comparación con la MFI de las células tratadas con disolvente o vehículo.

**Pertinencia:** Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un ensayo (21).

**Fiabilidad:** Medida del grado en que un ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (21).

**Tanda:** Una tanda consta del ensayo de uno o más productos de forma simultánea con un control del disolvente o vehículo y con un testigo positivo.

**Sensibilidad:** Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (21).

**Solución amortiguadora de tinción:** Solución salina amortiguadora de fosfato con un 0,1 % de seroalbúmina bovina.

**Control del disolvente o vehículo:** Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, excepto el producto problema, pero incluido el disolvente o vehículo utilizado. Se utiliza para establecer la respuesta de referencia para las muestras tratadas con el producto problema disuelto o disperso de forma estable en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un control del medio en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Especificidad:** Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (21).

**Sustancia:** Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición.

**Producto problema:** Sustancia o mezcla estudiada con este método.

▼**M8**

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas):** Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (23).

**UVCB:** Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja o materiales biológicos.

**Ensayo válido:** Ensayo del que se considera que tiene suficiente pertinencia y fiabilidad con un fin específico y que se basa en principios sólidos desde el punto de vista científico. Un ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado (21).

▼**M8**

*Apéndice 1.2*

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA

Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta obtención con el h.CLAT de la clasificación prevista de las diez sustancias recomendadas en el cuadro 1, y la obtención de valores de CV75, CE150 y CE200 que estén dentro del intervalo de referencia respectivo con al menos ocho de las diez sustancias utilizadas para demostrar la competencia. Estas sustancias de la prueba de la competencia se seleccionaron a fin de representar la gama de respuestas correspondientes a los peligros de sensibilización cutánea. Otros criterios de selección fueron que las sustancias estén disponibles en el mercado y que se disponga de datos de referencia *in vivo* de alta calidad, así como de datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el método h-CLAT. Asimismo, ha de disponerse de datos de referencia publicados sobre el método h-CLAT (3) (14).

*Cuadro 1*

**Sustancias recomendadas para demostrar la competencia técnica con el método h-CLAT**

| Sustancias para la competencia | N.º CAS | Estado físico | Asignación *in vivo* ([1]) | Intervalo de referencia de la CV75 en µg/ml ([2]) | Resultados con el h-CLAT sobre el CD86 (intervalo de referencia de la CE150 en µg/ml) ([2]) | Resultados con el h-CLAT sobre el CD54 (intervalo de referencia de la CE200 en µg/ml) ([2]) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 2,4-Dinitroclorobenceno | 97-00-7 | Sólido | Sensibilizante (extremo) | 2-12 | Positivo (0,5-10) | Positivo (0,5-15) |
| 4-Fenilendiamina | 106-50-3 | Sólido | Sensibilizante (fuerte) | 5-95 | Positivo (< 40) | Negativo (> 1,5) ([3]) |
| Sulfato de níquel | 10101-97-0 | Sólido | Sensibilizante (moderado) | 30-500 | Positivo (< 100) | Positivo (10-100) |
| 2-Mercaptobenzotiazol | 149-30-4 | Sólido | Sensibilizante (moderado) | 30-400 | Negativo (> 10) ([3]) | Positivo (10-140) |
| R(+)-Limoneno | 5989-27-5 | Líquido | Sensibilizante (débil) | > 20 | Negativo (> 5) ([3]) | Positivo (< 250) |
| Imidazolidinil-urea | 39236-46-9 | Sólido | Sensibilizante (débil) | 25-100 | Positivo (20-90) | Positivo (20-75) |
| Isopropanol | 67-63-0 | Líquido | No sensibilizante | > 5000 | Negativo (> 5000) | Negativo (> 5000) |
| Glicerol | 56-81-5 | Líquido | No sensibilizante | > 5000 | Negativo (> 5000) | Negativo (> 5000) |
| Ácido láctico | 50-21-5 | Líquido | No sensibilizante | 1500-5000 | Negativo (> 5000) | Negativo (> 5000) |
| Ácido 4-aminobenzoico | 150-13-0 | Sólido | No sensibilizante | > 1000 | Negativo (> 1000) | Negativo (> 1000) |

Abreviaturas: Nº CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

([1]) La asignación de peligro (y de potencia) *in vivo* se basa en datos del LLNA (3) (14). La potencia *in vivo* se obtiene con los criterios propuestos por ECETOC (24).

([2]) Sobre la base de los valores históricos observados (13) (25).

([3]) Históricamente, la mayoría de resultados negativos se ha obtenido con este marcador y, por tanto, se espera sobre todo un resultado negativo. El intervalo indicado se definió sobre la base de los escasos resultados positivos históricos observados. En caso de que se obtenga un resultado positivo, el valor de CE debe situarse dentro del intervalo de referencia notificado.

▼**M8**

*Apéndice 2*

SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: ENSAYO DE ACTIVACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR U937 (U-SENS™)

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

1. El ensayo U-SENS™ cuantifica el cambio en la expresión de un marcador de superficie celular asociado al proceso de activación de los monocitos y de las células dendríticas (DC) (es decir, el CD86), en la línea celular del linfoma histiocítico humano U937, tras la exposición a sensibilizantes (1). Los niveles de expresión medidos del marcador de superficie celular CD86 en la línea celular U937 se utilizan a continuación para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes.

2. El ensayo U-SENS™ se ha evaluado en un estudio de validación (2) coordinado por L'Oréal y objeto posteriormente de revisión por pares independientes en el Comité Científico Consultivo (ESAC) del laboratorio de referencia de la Unión Europea para las alternativas a los ensayos con animales (EURL ECVAM) (3). Teniendo en cuenta todas las pruebas disponibles y las aportaciones de los reguladores y de las partes interesadas, el EURL ECVAM recomendó que el U-SENS™ se utilizara como parte de un enfoque IATA para justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes a efectos de la clasificación de los peligros y el etiquetado (4). En su documento de orientación sobre la información de los enfoques estructurados relativos a la integración de datos y a las distintas fuentes de información utilizadas en los enfoques IATA en relación con la sensibilización cutánea, la OCDE examina actualmente una serie de estudios de casos que describen diferentes estrategias de ensayo y modelos de asignación. Uno de los diferentes enfoques definidos se basa en el ensayo U-SENS (5). En otras citas de la bibliografía (4) (5) (7) también se incluyen ejemplos de uso de los datos del ensayo U-SENS™ en combinación con otra información, incluidos datos históricos y datos humanos válidos ya existentes (6).

3. Se ha demostrado que el ensayo U-SENS™ puede transferirse a laboratorios con experiencia en técnicas de cultivo celular y análisis de citometría de flujo. El nivel de reproducibilidad de las asignaciones que cabe esperar del ensayo es del orden del 90 % y del 84 % dentro de un laboratorio y entre laboratorios, respectivamente (8). Los resultados obtenidos en el estudio de validación (8) y otros estudios publicados (1) indican en general que, en comparación con los resultados del LLNA, la exactitud de la distinción de los sensibilizantes cutáneos (es decir, categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) frente a los no sensibilizantes es del 86 % (N = 166), con una sensibilidad del 91 % (118/129) y una especificidad del 65 % (24/37). En comparación con los resultados obenidos con seres humanos, la exactitud de la distinción de los sensibilizantes cutáneos (es decir, categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) frente a los no sensibilizantes es del 77 % (N = 101), con una sensibilidad del 100 % (58/58) y una especificidad del 47 % (20/43). Es más probable que las asignaciones negativas falsas obtenidas con el ensayo U-SENS™ en comparación con el LLNA afecten a los productos que muestran una potencia de sensibilización cutánea baja o moderada (es decir, subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) que los productos que presentan una potencia de sensibilización cutánea elevada (es decir, subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (1) (8) (9). En conjunto, esta información indica la utilidad del ensayo U-SENS™ para contribuir a la identificación de los peligros de sensibilización cutánea. Sin embargo, los valores de la exactitud aquí indicados para el U-SENS™ utilizado como ensayo único solo son indicativos, ya que el ensayo debe considerarse en combinación con otras fuentes de información en el contexto de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 7 y 8 de la introducción general. Además, a la hora de evaluar los métodos de ensayo de la sensibilización cutánea sin animales, debe tenerse en cuenta que el ensayo LLNA y otros ensayos con animales pueden no reflejar plenamente la situación en los seres humanos.

▼**M8**

4. Sobre la base de los datos actualmente disponibles, se ha demostrado que el ensayo U-SENS™ es aplicable a productos problema (incluidos los ingredientes de cosméticos, como los conservantes, tensioactivos, sustancias activas, colorantes, etc.) que abarcan una variedad de grupos funcionales orgánicos, de propiedades fisicoquímicas, de potencia de sensibilización cutánea (determinada en estudios *in vivo*) y el espectro de mecanismos de reacción de los que se sabe que están asociados con la sensibilización cutánea (como, por ejemplo, aceptor de Michael, formación de bases de Schiff, agentes de transferencia de grupos acilo, sustitución nucleofílica bi-molecular [SN2], o sustitución nucleofílica aromática [SNAr]) (1) (8) (9) (10). El ensayo U-SENS™ es aplicable a los productos problema que son solubles o que forman una dispersión estable (es decir, un coloide o una suspensión en la que el producto problema no sedimenta ni se separa del disolvente o vehículo para formar distintas fases) en un disolvente o vehículo adecuado (véase el punto 13). Los productos que en el conjunto de datos figuran como pre-haptenos (es decir, sustancias que se activan por oxidación) o pro-haptenos (es decir, sustancias que requieren activación enzimática, por ejemplo mediante enzimas P450) fueron clasificados correctamente por el ensayo U-SENS™ (1) (10). Las sustanciasque alteran la membrana pueden dar lugar a resultados positivos falsos debido a un aumento inespecífico de la expresión del CD86, ya que eran tensioactivos tres de los siete falsos positivos en relación con la clasificación de referencia *in vivo* (1). Tales resultados positivos con los tensioactivos deben considerarse con precaución, mientras que los resultados negativos con los tensioactivos podrían seguir utilizándose para apoyar la identificación del producto problema como no sensibilizante. Los productos problema fluorescentes pueden evaluarse con el ensayo U-SENS™ (1); sin embargo, los productos problema muy fluorescentes que emiten a la misma longitud de onda que el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o que el yoduro de propidio (PI) pueden interferir con la detección por citometría de flujo y, por tanto, no pueden evaluarse correctamente utilizando anticuerpos conjugados con el FITC (posibles falsos negativos) ni con el PI (no puede medirse la viabilidad). En tal caso, pueden utilizarse otros anticuerpos marcados con fluorocromos u otros marcadores de citotoxicidad, según corresponda, siempre que se demuestre que proporcionan resultados similares a los de los anticuerpos marcados con FITC o PI (véase el punto 18), por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para la prueba de la competencia recogidas en el apéndice 2.2. A la luz de lo anterior, los resultados positivos obtenidos con tensioactivos y los resultados negativos obtenidos con fluorescentes fuertes deben interpretarse en el contexto de las limitaciones indicadas y junto con otras fuentes de información en el marco de los enfoques IATA. En los casos en que haya pruebas que demuestren la inaplicabilidad del ensayo U-SENS™ a otras categorías específicas de productos problema, no deberá utilizarse este ensayo con tales categorías específicas.

5. Tal como se ha descrito anteriormente, el ensayo U-SENS™ sirve para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes. No obstante, podrá contribuir también a la evaluación de la potencia sensibilizante cuando se utilice en enfoques integrados, como los enfoques IATA. Sin embargo, es necesario seguir trabajando, preferentemente a partir de datos con seres humanos, para determinar de qué modo los resultados del ensayo U-SENS™ pueden informar sobre la evaluación de la potencia.

6. En el apéndice 2.1 se dan las definiciones pertinentes.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. El U-SENS™ es un ensayo *in vitro* que cuantifica los cambios de la expresión del marcador de superficie celular CD86 en las células U937 de la línea celular del linfoma histiocitico humano, tras una exposición de 45 ± 3 horas al producto problema. El marcador de superficie CD86 es un marcador típico de la activación de U937. Se sabe que el CD86 es una molécula coestimuladora que puede imitar la activación monocítica, la cual desempeña un papel fundamental en la estimulación de las células T. Los cambios en la expresión del marcador de superficie celular CD86 se miden recurriendo a la citometría de flujo tras la tinción celular normalmente mediante anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC). También se lleva a cabo simultáneamente una medición de la citotoxicidad (p. ej., utilizando PI) con

▼M8

el fin de evaluar si a concentraciones subcitotóxicas se produce un incremento de la expresión del marcador de superficie celular CD86. Se calcula el índice de estimulación (IE) del marcador de superficie celular CD86 en comparación con el control del disolvente o de vehículo y se utiliza en el modelo de asignación (véase el punto 19), a fin de justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes.

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

8. Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método de ensayo B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el apéndice 2.2, de conformidad con las buenas prácticas de los métodos *in vitro* (11). Por otra parte, los usuarios del ensayo deben mantener una base de datos históricos que contenga los generados en los controles de reactividad (véase el punto 11) y con los testigos positivos y los controles del disolvente o vehículo (véanse los puntos 15-16), y utilizar estos datos para confirmar que la reproducibilidad del ensayo en su laboratorio se mantiene a lo largo del tiempo.

PROCEDIMIENTO

9. Este ensayo se basa en el protocolo n.º 183 de servicio de la base de datos de U-SENS™ sobre métodos alternativos a la experimentación con animales (DB-ALM) (12). Deben emplearse procedimientos normalizados de trabajo (PNT) a la hora de aplicar y utilizar el ensayo U-SENS™ en el laboratorio. Puede utilizarse un sistema automatizado para llevar a cabo el ensayo U-SENS™, si puede demostrarse que proporciona resultados similares, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para la prueba de la competencia recogidas en el apéndice 2.2. A continuación se recoge una descripción de los principales componentes y procedimientos del ensayo U-SENS™.

**Preparación de las células**

10. Para llevar a cabo el ensayo U-SENS™ debe utilizarse la línea celular del linfoma histiocítico humano, U937 (13). Las células (clon CRL1593.2) deben obtenerse de un banco de células adecuado, como la American Type Culture Collection.

11. Se cultivan células U937 a 37 °C, en atmósfera humidificada y con un 5 % de $CO_2$, en medio RPMI-1640 complementado con un 10 % de suero de ternera fetal (FCS), L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Se hace un pase de las células U937 sistemáticamente cada 2-3 días a una densidad de 1,5 a 3 × $10^5$ células/ml, respectivamente. La densidad celular no debe superar el valor de 2 × $10^6$ células/ml y la viabilidad celular medida mediante la exclusión del azul tripano debe ser ≥ 90 % (no debe aplicarse al primer pase después de la descongelación). Antes de utilizarlos para el ensayo, cada lote de células, FCS o anticuerpos deben ser objeto de un control de reactividad. El control de reactividad de las células debe realizarse utilizando el testigo positivo, ácido picrilsulfónico (ácido 2,4,6-trinitro-bencenosulfónico, TNBS) (n.º CAS 2508-19-2, ≥ 99 % de pureza), y el testigo negativo, ácido láctico (LA) (n.º CAS 50-21-5, ≥ 85 % de pureza), al menos una semana después de la descongelación. En el control de reactividad, se deben someter a ensayo seis concentraciones finales de cada uno de los dos testigos (TNBS: 1, 12,5, 25, 50, 75, 100 µg/ml, y LA: 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml). El TNBS solubilizado en medio completo debe dar una respuesta del CD86 positiva y relacionada con la concentración (p. ej., cuando una concentración positiva, con IE de CD86 ≥ 150, va seguida de una concentración con un aumento del IE de CD86), y el LA solubilizado en medio completo debe dar una respuesta del CD86 negativa (véase el punto 21). Solo se puede utilizar para el ensayo el lote de células que haya superado dos veces el control de reactividad. Las células pueden propagarse hasta siete semanas después de la descongelación. El número de pases no debe ser superior a 21. El control de reactividad debe realizarse con arreglo a los procedimientos descritos en los puntos 18 a 22.

▼M8

12. Para el ensayo, se siembran células U937 a una densidad de $3 \times 10^5$ células/ml o $6 \times 10^5$ células/ml, y se precultivan en matraces de cultivo durante 2 días o durante 1 día, respectivamente. Podrán utilizarse otras condiciones de precultivo si se presenta una justificación científica suficiente y si puede demostrarse que proporcionan resultados similares, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias para la prueba de la competencia recogidas en el apéndice 2.2. En el día del ensayo, se toman células del matraz de cultivo y se suspenden con medio de cultivo fresco a la concentración de $5 \times 10^5$ células/ml. A continuación, se distribuyen las células en una placa de fondo plano de 96 pocillos con 100 µl (densidad celular final de $0{,}5 \times 10^5$ células/pocillo).

**Preparación de los productos problema y de las sustancias testigo**

13. La evaluación de la solubilidad se realiza antes del ensayo. Con este fin, los productos problema se disuelven o se dispersan de forma estable a una concentración de 50 mg/ml en medio completo como disolvente de primera opción o en dimetilsulfóxido (DMSO, ≥ 99 % de pureza) como vehículo/disolvente de segunda opción si el producto problema no es soluble en el disolvente o vehículo de medio completo. Para el ensayo, el producto problema se disuelve hasta una concentración final de 0,4 mg/ml en medio completo si el producto es soluble en este disolvente o vehículo. Si el producto es soluble únicamente en DMSO, se disuelve a una concentración de 50 mg/ml. Podrán utilizarse otros disolventes/vehículos distintos de los descritos anteriormente si se presenta una justificación científica suficiente. Debe tenerse en cuenta la estabilidad del producto problema en el disolvente o vehículo final.

14. Los productos problema y las sustancias testigo se preparan el día del ensayo. Dado que no se realiza un ensayo de determinación de la dosis, para la primera tanda se deben ensayar seis concentraciones finales (1, 10, 20, 50, 100 y 200 µg/ml) en el disolvente o vehículo correspondiente, bien en medio completo o bien en DMSO al 0,4 % en medio. Para las tandas siguientes, a partir de las soluciones de los productos problema de 0,4 mg/ml en medio completo o de 50 mg/ml en DMSO, se preparan, al menos cuatro soluciones de trabajo (es decir, al menos cuatro concentraciones), utilizando el disolvente o vehículo correspondiente. Las soluciones de trabajo se utilizan finalmente para el tratamiento añadiendo un volumen igual de suspensión celular U937 (véase el punto 11) al volumen de la solución de trabajo en la placa para lograr una dilución adicional a la mitad (12). Las concentraciones (al menos cuatro concentraciones) para cualquier otra tanda se eligen sobre la base de los distintos resultados de todas las tandas anteriores (8). Las concentraciones finales utilizables son 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180 y 200 µg/ml. La concentración máxima final es de 200 µg/ml. En caso de que se observe un valor positivo de CD86 a 1 µg/ml, se evalúa entonces a 0,1 µg/ml para encontrar la concentración del producto problema que no induce al CD86 por encima del umbral positivo. Con cada tanda, se calcula la CE150 (concentración a la que un producto alcanza el umbral positivo de CD86 del 150 %; véase elpunto 19) si se observa una relación positiva entre la respuesta del CD86 y la concentración. Cuando el producto problema induzca una respuesta positiva del CD86 no relacionada con la concentración, el cálculo de la CE150 podría no ser pertinente, como se describe en el protocolo n.º 183 de la DB-ALM de U-SENS™ (12). Con cada tanda, se calcula la CV70 (concentración a la que un producto alcanza el umbral de citotoxicidad del 70 %, véase el punto 19) siempre que sea posible (12). Para investigar el efecto de respuesta a la concentración como aumento de CD86, deben elegirse cualesquiera concentraciones de entre las utilizables, repartidas de forma uniforme entre la CE150 (o la mayor concentración no citotóxica negativa respecto al CD86) y la CV70 (o la mayor concentración permitida, es decir, 200 µg/ml). Se deben someter a ensayo como mínimo cuatro concentraciones por tanda, con un mínimo de dos concentraciones comunes con las de la tanda o tandas anteriores, con fines comparativos.

▼M8

15. El control del disolvente o vehículo utilizado en el ensayo U-SENS™ es el medio completo (en el caso de los productos problema solubilizados o dispersos de forma estable en medio completo) (véase el punto 4) o DMSO al 0,4 % en medio completo (en el caso de los productos problema solubilizados o dispersos de forma estable en DMSO).

16. El testigo positivo utilizado en el ensayo U-SENS™ es el TNBS (véase el punto 11), preparado en el medio completo. El TNBS debe utilizarse como testigo positivo para la medición de la expresión de CD86 a una única concentración final en la placa (50 µg/ml) que da > 70 % de viabilidad celular. Para obtener una concentración de 50 µg/ml de TNBS en la placa, se prepara una solución madre de TNBS 1 M (es decir, 293 mg/ml) en medio completo, y se diluye después 2 930 veces con medio completo hasta conseguir una solución de trabajo de 100 µg/ml. El ácido láctico (LA, n.º CAS 50-21-5) debe utilizarse como testigo negativo a 200 µg/ml solubilizado en medio completo (a partir de una solución madre de 0,4 mg/ml). En cada placa de cada tanda se preparan tres réplicas del control de medio completo no tratado, del control del disolvente o del vehículo, y de los testigos positivos y negativos (12). Podrán utilizarse otros testigos positivos adecuados si se dispone de datos históricos para obtener criterios comparables de aceptación de tandas. Los criterios de aceptación de tandas son los mismos que los descritos para el producto problema (véase el punto 12).

**Aplicación de los productos problema y de las sustancias testigo**

17. El control del disolvente o del vehículo o las soluciones de trabajo descritas en los puntos 14-16 se mezclan 1: 1 (v/v) con las suspensiones celulares preparadas en la placa de fondo plano de 96 pocillos (véase el punto 12). A continuación, las placas tratadas se incuban durante 45 ± 3 horas a 37ºC con 5 % de $CO_2$. Antes de la incubación, las placas se sellan con una membrana semipermeable, para evitar la evaporación de los productos problema volátiles y la contaminación cruzada entre células tratadas con productos problema (12).

**Tinción celular**

18. Tras 45 ± 3 horas de exposición, las células se transfieren a una placa de microvaloración con forma de V y se recogen por centrifugación. La interferencia de la solubilidad se define como cristales o gotas observadas al microscopio a las 45 ± 3 horas después del tratamiento (antes de la tinción celular). Los sobrenadantes se desechan y las células restantes se lavan una vez con 100 µl de una solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) enfriada con hielo y que contiene un 5 % de suero de ternera fetal (solución amortiguadora de tinción). Tras la centrifugación, se vuelven a suspender las células con 100 µl de solución amortiguadora de tinción y se tiñen con 5 µl (p. ej., 0,25 µg) de anticuerpos anti-CD86 marcados con FITC o IgG1 (isotipo) de ratón a 4ºC durante 30 min protegidas de la luz. Deben utilizarse los anticuerpos descritos en el protocolo n.º 183 de la DB-ALM de U-SENS™ (12) (para CD86: BD-PharMingen, # 555 657 Clon: Fun-1, o Caltag/Invitrogen # MHCD8601 Clon: BU63; y para IgG1: BD-PharMingen #555 748, o Caltag/Invitrogen # GM4992). Según la experiencia de los desarrolladores del ensayo, la intensidad de la fluorescencia de los anticuerpos suele ser coherente entre los diferentes lotes. Para el ensayo podrán utilizarse otros clones o proveedores de anticuerpos que hayan superado el control de reactividad (véase el punto 11). No obstante, los usuarios pueden considerar la valoración de los anticuerpos en las condiciones de su propiolaboratorio a fin de determinar la mejor concentración que han de utilizar. Podrá utilizarse otro sistema de detección como, p. ej., anticuerpos marcados con fluorocromo antiCD86, si se puede demostrar que proporcionan resultados similares a los de anticuerpos conjugados con FITC, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias utilizadas para demostrar la competencia que se indican en el apéndice 2.2. Después de lavar dos veces con 100 µl de solución amortiguadora de tinción y una vez con 100 µl de PBS enfriada con hielo, se vuelven a suspender las células en PBS enfriada con hielo (por ejemplo, 125 µl en caso de muestras analizadas manualmente tubo por tubo, o 50 µl si se utiliza una placa de auto-muestreador) y se añade una solución de PI (concentración final de 3 µg/ml). Pueden utilizarse

▼M8

otros marcadores de citotoxicidad, tales como la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) o el azul tripano, si se puede demostrar que las tinciones alternativas ofrecen resultados similares a los del PI, por ejemplo sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia que figuran en el apéndice 2.2.

**Análisis por citometría de flujo**

19. Se analiza el nivel de expresión de CD86 y la viabilidad celular utilizando la citometría de flujo. Las células se representan dentro de una gráfica de puntos de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) a escala logartítmica, a fin de identificar claramente a la población en una primera ventana R1 y eliminar los desechos. El objetivo es medir un total de 10 000 células en la ventana R1 para cada pocillo. Las células de la misma ventana R1 se representan dentro de una gráfica de puntos FL3 o FL4 / SSC. Las células viables se definen mediante la separación de una segunda ventana R2 que seleccione la población de células negativas para el yoduro de propidio (canal FL3 o FL4). La viabilidad celular puede calcularse con la siguiente ecuación por el programa de análisis del citómetro. Cuando la viabilidad celular es baja, podrán medirse hasta 20 000 células, incluidas las células muertas. Como alternativa, también es posible medir los datos durante un minuto tras el inicio del análisis.

$$Viabilidad\ celular = \frac{Número\ de\ células\ vivas}{Número\ total\ de\ células\ adquiridas} \times 100$$

A continuación se mide el porcentaje de células FL1-positivas entre estas células viables seleccionadas en R2 (dentro de R1). La expresión en la superficie celular del CD86 se analiza en una gráfica de puntos de FL1/SSC seleccionada en células viables (R2).

En el caso de los pocillos de medio completo / IgG1, el marcador de análisis se sitúa cerca de la población principal, de manera que los controles del medio completo tengan IgG1 dentro de la zona diana del 0,6 al 0,9 %.

La interferencia del color se define como un desplazamiento de la gráfica de puntos de IgG1 marcada con FITC (media geométrica del IE de IgG1 FL1 ≥ 150 %).

Los índices de estimulación (IE) del CD86 en las células del control (sin tratar o en un 0,4 % de DMSO) y en las células tratadas con producto se calculan de acuerdo con la ecuación siguiente:.

$$IE = \frac{\%\ de\ células\ tratadas\ CD86^{+} - de\ células\ tratadas^{+}}{\%\ de\ células\ del\ control\ CD86^{+} - \%\ de\ células\ del\ control\ IgG^{+}} \times 100$$

% de células del control sin tratar $IgG1^{+}$: indicado como porcentaje de las células IgG1 FL1-positivas definidas con el marcador de análisis (intervalo aceptado de ≥ 0,6 % y < 1,5 %, véase el punto 22) entre las células viables sin tratar.

% de células control/tratadas $IgG1^{+}/CD86^{+}$: indicado como porcentaje de células IgG1/CD86 FL1-positivas medidas sin desplazar el marcador de análisis entre las células control/tratadas viables.

▼**M8**

DATOS E INFORME

**Evaluación de los datos**

20. En el ensayo U-SENS™ se calculan los parámetros siguientes: valor de CV70, es decir, concentración que muestra el 70 % de la supervivencia celular de U937 (30 % de citotoxicidad) y valor de EC150, es decir, la concentración a la que los productos problema han inducido un índice de estimulación (IE) de CD86 del 150 %.

CV70 se calcula por interpolación semilogarítmica mediante la ecuación siguiente:

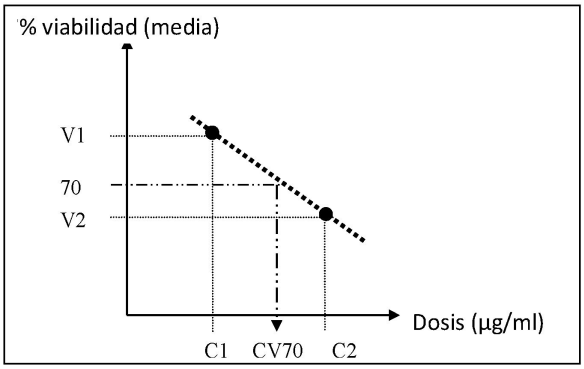
$$CV70 = C1 + [(V1 - 70) / (V1 - V2) * (C2 - C1)]$$

donde:

V1 es el valor mínimo de viabilidad celular superior al 70 %;

V2 es el valor máximo de viabilidad celular inferior al 70 %;

C1 y C2 son las concentraciones que muestran los valores de viabilidad celular V1 y V2, respectivamente.




Pueden utilizarse otros enfoques para obtener el valor de CV70 siempre que se demuestre que esto no afecta a los resultados (por ejemplo, sometiendo a ensayo las sustancias para demostrar la competencia).

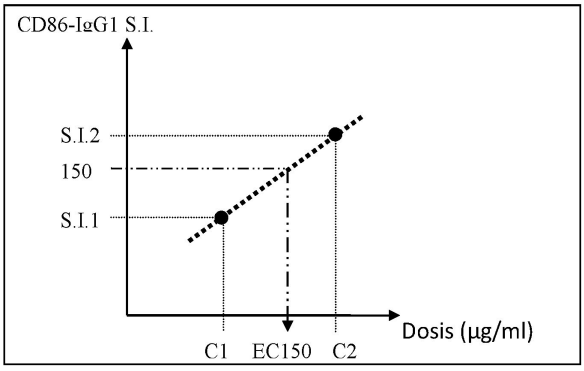
EC150 se calcula por interpolación semilogarítmica mediante la ecuación siguiente:

$$EC150 = C1 + [(150 - IE1) / (IE2 - IE1) * (C2 - C1)]$$

donde:

C1 es la concentración más alta en µg/ml con un IE de CD86 < 150 % (IE 1)

C2 es la concentración más baja en µg/ml con un IE de CD86 ≥ 150 % (IE 2).



▼**M8**

Se calculan los valores de CE150 y CV70 según lo siguiente:

— con cada tanda: los valores individuales de CE150 y CV70 se utilizan como herramientas para investigar el efecto de respuesta a la concentración como aumento del CD86 (véase el punto 14),

— sobre la base de las viabilidades medias, se determina el valor global de CV70 (12),

— sobre la base de los valores medios del IE de CD86, se determina la CE150 global del producto problema clasificado como POSITIVO con el U-SENS™ (véase el punto 21) (12).

**Modelo de asignación**

21. Para la medición de la expresión de CD86, cada producto problema se somete en al menos dos concentraciones al menos a dos tandas independientes (realizadas en días diferentes) a fin de obtener una única asignación (POSITIVA o NEGATIVA).

— La conclusión individual de una tanda de U-SENS™ se considera negativa (en lo sucesivo, "N") si el IE de CD86 es inferior al 150 % en todas las concentraciones no citotóxicas (viabilidad celular ≥ 70 %) y si no se observa interferencia [citotoxicidad, solubilidad (véase el punto 18) o color (véase el punto 19), con independencia de las concentraciones no citotóxicas a las que se detecte la interferencia]. En todos los demás casos (con el IE de CD86 superior o igual al 150 % y/o con interferencias observadas), la conclusión individual de una tanda U-SENS™ se considera positiva (en lo sucesivo, "P").

— Una asignación U-SENS™ se considera NEGATIVA si al menos dos tandas independientes son negativas (N) (figura 1). Si las dos primeras tandas son negativas (N), la asignación de U-SENS™ se considera NEGATIVA y no es necesario realizar la tercera tanda.

— Una asignación U-SENS™ se considera POSITIVA si al menos dos tandas independientes son positivas (P) (figura 1). Si las dos primeras tandas son positivas (P), la asignación de U-SENS™ se considera POSITIVA y no es necesario realizar la tercera tanda.

— Dado que no se ha realizado un ensayo de determinación de la dosis, hay una excepción si, en la primera tanda, el IE de CD86 es superior o igual al 150 % únicamente a la concentración no citotóxica más alta. La tanda se considera entonces NO CONCLUYENTE (NC), y deben someterse a ensayo, en tandas adicionales, otras concentraciones (entre la concentración no citotóxica más alta y la concentración citotóxica más baja, véase el punto 20). En caso de que una tanda se identifique como NC, deberán realizarse al menos dos tandas adicionales, y una cuarta tanda en caso de que las tandas 2 y 3 no sean concordantes (N y/o P independientemente) (figura 1). Las tandas de seguimiento se considerarán positivas aunque solo una concentración no citotóxica dé un CD86 igual o superior al 150 %, ya que la concentración se ha ajustado para el producto problema específico. La asignación final se basará en el resultado mayoritario de las tres o cuatro tandas individuales (es decir, 2 de 3 o 2 de 4) (figura 1).

▼**M8**

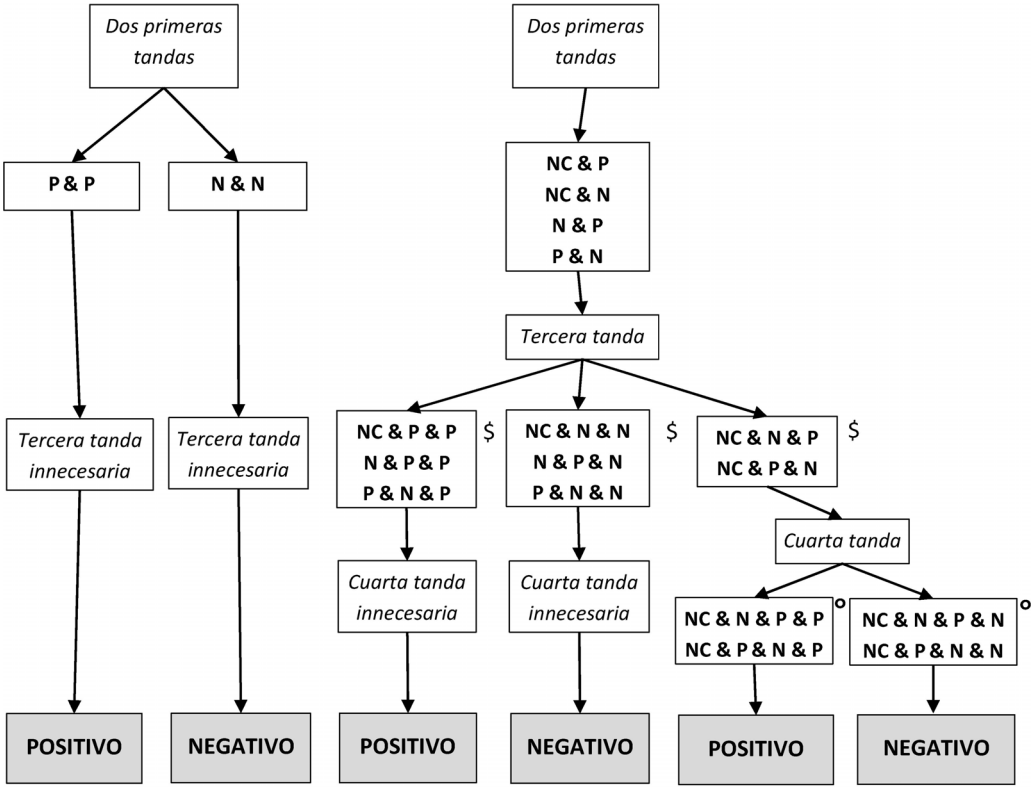



**Figura 1** Modelo de asignación utilizado en el ensayo U-SENS™. Las asignaciones obtenidas con el U-SENS™ deben interpretarse en el marco de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones del punto 4 y de los puntos 7,8 y 9 de la introducción general.

N: Tanda sin observación de resultado positivo del CD86 o de interferencia;

P: Tanda con observación de resultado positivo del CD86 y/o de interferencia o interferencias;

NC: No concluyente. Primera tanda no concluyente, cuando CD86 es positivo solo a la concentración no citotóxica más alta;

#: Un resultado individual no concluyente (NC) atribuido únicamente a la primera tanda implica automáticamente la necesidad de efectuar una tercera tanda para alcanzar una mayoría de resultados positivos (P) o negativos (N) en al menos 2 de 3 tandas independientes.

$: Los recuadros muestran las combinaciones pertinentes de resultados de las tres tandas sobre la base de los resultados obtenidos en las dos primeras, indicadas en el recuadro superior.

°: Los recuadros muestran las combinaciones pertinentes de resultados de las cuatro tandas sobre la base de los resultados obtenidos en las tres primeras, indicadas en el recuadro superior.

**Criterios de aceptación**

22. Cuando se use el ensayo U-SENS™ deben cumplirse los siguientes criterios de aceptación (12).

— Al final del período de exposición de 45 ± 3 horas, la viabilidad media de las células U937 sin tratar en triplicado ha de ser superior al 90 % y no debe observarse ninguna deriva en la expresión de CD86. La expresión basal de CD86 de las células U937 sin tratar debe estar comprendida entre ≥ 2 % y ≤ 25 %.

▼M8

— Cuando se utiliza el DMSO como disolvente, la validez del control del vehículo DMSO se evalúa calculando un valor del IE con DMSO comparado con el de las células no tratadas, y la viabilidad media de las células en triplicado debe ser superior al 90 %. El control del vehículo DMSO es válido si la media de los tres valores del IE de CD86 con él es inferior al 250 % de la media de los tres valores del IE de CD86 de las células U937 sin tratar.

— Las tandas se consideran válidas si al menos dos de los tres valores de IgG1 de células de U937 sin tratar caen dentro del intervalo de ≥ 0,6 % y < 1,5 %.

— El testigo negativo (ácido láctico) en paralelo se considera válido si al menos dos de las tres réplicas son negativas (IE de CD86 < 150 %) y no citotóxicas (viabilidad celular ≥ 70 %).

— El testigo positivo (TNBS) se considera válido si al menos dos de las tres réplicas son positivas (IE de CD86 ≥ 150 %) y no citotóxicas (viabilidad celular ≥ 70 %).

**Informe del ensayo**

23. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema*

Sustancias de un solo componente

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Aspecto físico, solubilidad en el medio completo, solubilidad en DMSO, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas:

— Caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), en la medida de lo posible;

— Aspecto físico, solubilidad en el medio completo, solubilidad en DMSO y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

— Peso molecular o peso molecular aparente en el caso de mezclas/polímeros de composición conocida u otra información pertinente para la realización del estudio;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

▼**M8**

*Testigos y controles*

Testigo positivo

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Aspecto físico, solubilidad en DMSO, peso molecular y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible y en los casos aplicables;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Referencia a los resultados de los testigos positivos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación de las tandas, si procede.

Testigo negativo y control del disolvente o vehículo

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Aspecto físico, peso molecular, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales en el caso de que se utilicen unos controles de disolvente o vehículo distintos de los especificados en las directrices del ensayo y en la medida de lo posible;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema.

*Condiciones de ensayo*

— Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;

— Descripción del ensayo utilizado;

— Línea celular utilizada, sus condiciones de conservación y su origen (por ejemplo, instalación en la que se ha obtenido);

— Citometría de flujo utilizada (por ejemplo, modelo), incluidos los ajustes instrumentales, los anticuerpos y el marcador de citotoxicidad utilizados;

— Procedimiento utilizado para demostrar la competencia del laboratorio en la realización del ensayo mediante el ensayo de sustancias destinadas a tal fin, y el procedimiento utilizado para demostrar que el ensayo tiene un comportamiento reproducible a lo largo del tiempo, por ejemplo datos de testigos históricos o datos históricos de controles de la reactividad.

*Criterios de aceptación del ensayo*

— Valores de la viabilidad celular y del IE de CD86 obtenidos con el control del disolvente o vehículo en comparación con los intervalos de aceptación;

▼**M8**

— Valores de la viabilidad celular y del IE obtenidos con el testigo positivo en comparación con los intervalos de aceptación;

— Viabilidad celular de todas las concentraciones sometidas a ensayo del producto problema.

*Procedimiento de ensayo*

— Número de tandas utilizadas;

— Concentraciones del producto problema, tiempo de aplicación y de exposición utilizado (si es diferente del recomendado);

— Duración de la exposición;

— Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo.

*Resultados*

— Tabulación de los datos, incluidos la CV70 (si procede), el IE, los valores de viabilidad celular, los valores de CE150 (si procede) obtenidos con el producto problema y con el testigo positivo en cada tanda, y una indicación de la calificación del producto problema según el modelo de asignación;

— Descripción de cualesquiera otras observaciones pertinentes, si procede.

*Discusión de los resultados*

— Discusión de los resultados obtenidos con el ensayo U-SENS™;

— Consideración de los resultados del ensayo obtenidos en el contexto de un enfoque IATA, si se dispone de otra información pertinente.

*Conclusiones*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Piroird, C., Ovigne, J.M., Rousset, F., Martinozzi-Teissier, S., Gomes, C., Cotovio, J., Alépée, N. (2015). The Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS) addresses the activation of dendritic cell event in the adverse outcome pathway for skin sensitization. *Toxicol. In Vitro* 29, 901-916.

(2) EURL ECVAM (2017). The U-SENS™ test method Validation Study Report. Puede consultarse en: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/eurl-ecvam-recommendations

(3) EC EURL ECVAM (2016). ESAC Opinion No 2016-03 on the L'Oréal-coordinated study on the transferability and reliability of the U-SENS™ test method for skin sensitisation testing. EUR 28 178 EN; doi 10.2787/815737. Disponible en: [http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC103705].

(4) EC EURL ECVAM (2017). EURL ECVAM Recommendation on the use of non-animal approaches for skin sensitisation testing. EUR 28 553 EN; doi 10.2760/588955. Disponible en: https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/eur-scientific-and-technical-research-reports/eurl-ecvam-recommendation-use-non-animal-approaches-skin-sensitisation-testing.

(5) Steiling, W. (2016). Safety Evaluation of Cosmetic Ingredients Regarding their Skin Sensitization Potential. doi:10.3390/cosmetics3020014.*Cosmetics* 3, 14.

▼**M8**

(6) OCDE (2016). Guidance Document on The Reporting of Defined Approaches and Individual Information Sources to be Used Within Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(7) Urbisch, D., Mehling, A., Guth, K., Ramirez, T., Honarvar, N., Kolle, S., Landsiedel, R., Jaworska, J., Kern, P.S., Gerberick, F., Natsch, A., Emter, R., Ashikaga, T., Miyazawa, M., Sakaguchi, H. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 71, 337-351.

(8) Alépée, N., Piroird, C., Aujoulat, M., Dreyfuss, S., Hoffmann, S., Hohenstein, A., Meloni, M., Nardelli, L., Gerbeix, C., Cotovio, J. (2015). Prospective multicentre study of the U-SENS test method for skin sensitization testing. *Toxicol In Vitro* 30, 373-382.

(9) Reisinger, K., Hoffmann, S., Alépée, N., Ashikaga, T., Barroso, J., Elcombe, C., Gellatly, N., Galbiati, V., Gibbs, S., Groux, H., Hibatallah, J., Keller, D., Kern, P., Klaric, M., Kolle, S., Kuehnl, J., Lambrechts, N., Lindstedt, M., Millet, M., Martinozzi-Teissier, S., Natsch, A., Petersohn, D., Pike, I., Sakaguchi, H., Schepky, A., Tailhardat, M., Templier, M., van Vliet, E., Maxwell, G. (2014). Systematic evaluation of non-animal test methods for skin sensitisation safety assessment. *Toxicol. In Vitro* 29, 259-270.

(10) Fabian, E., Vogel, D., Blatz, V., Ramirez, T., Kolle, S., Eltze, T., van Ravenzwaay, B., Oesch, F., Landsiedel, R. (2013). Xenobiotic metabolizin enzyme activities in cells used for testing skin sensitization *in vitro*. *Arch. Toxicol.* 87, 1683-1696.

(11) OECD (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(12) DB-ALM (2016). Protocol no 183: Myeloid U937 Skin Sensitization Test (U-SENS™), 33 pp. Puede consultarse en: [http://ecvam-dbalm.jrc.ec.europa.eu/].

(13) Sundström, C., Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.

(14) OCDE (2005). Series on Testing and Assessment No. 34: Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(15) Naciones Unidas (2015). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). ST/SG/AC.10/30/Rev.6, Sixth Revised Edition, New York & Geneva: Publicaciones de las Naciones Unidas. Disponible en: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev06/English/ST-SG-AC10-30-Rev6e.pdf.

(16) OCDE (2012). Series on Testing and Assessment No 168: The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins. Part 1: Scientific Evidence. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(17) ECETOC (2003). Technical Report No 87: Contact sensitization: Classification according to potency. European Centre for Ecotoxicology & Toxicology of Chemicals, Brussels. Disponible en: https://ftp.cdc.gov/pub/Documents/OEL/06.%20Dotson/References/ECETOC_2003-TR87.pdf.

▼**M8**

*Apéndice 2.1*

DEFINICIONES

**Exactitud:** Grado de coincidencia entre los resultados del ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de concordancia se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un ensayo (14).

**Ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*):** Secuencia de fenómenos desde la estructura química de un producto diana o grupo de productos similares, pasando por el fenómeno molecular desencadenante, hasta un resultado *in vivo* de interés (15).

**Respuesta del CD86 a la concentración:** Se produce dependencia de la concentración (o respuesta a la concentración) cuando una concentración positiva (con IE de CD86 ≥ 150) va seguida de una concentración con un aumento del IE de CD86.

**Producto:** Sustancia o mezcla.

**CV70:** Concentración estimada que muestra una viabilidad celular del 70 %.

**Deriva:** La deriva se define por lo siguiente i) el valor corregido del % $CD86^+$ de la réplica 3 del testigo no tratado es inferior al 50 % de la media del valor corregido del % $CD86^+$ de las réplicas 1 y 2 de los testigos no tratados; y ii) el valor corregido del % $CD86^+$ de la réplica 3 del testigo negativo es inferior al 50 % de la media del valor corregido del % $CD86^+$ de las réplicas 1 y 2 de los testigos negativos.

**CE150:** Concentraciones estimadas que muestran un IE de expresión del CD86 del 150 %.

**Citometría de flujo:** Técnica de citometría en la que las células suspendidas en un fluido fluyen una a una a través de un foco de luz excitadora, que se dispersa en patrones característicos según las células y sus componentes; las células están marcadas frecuentemente con marcadores fluorescentes, de modo que la luz se absorbe primero y, a continuación, se emite con una frecuencia modificada.

**Peligro:** Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**IATA (Enfoque integrado de pruebas y evaluación, *Integrated Approach to Testing and Assessment*):** Enfoque estructurado para la identificación del peligro (potencial), caracterización del peligro (potencia) o evaluación de la seguridad (potencial/potencia y exposición) de un producto o grupo de productos, que integra y pondera de forma estratégica todos los datos pertinentes para fundamentar una decisión normativa relativa a posibles peligros o riesgos o a la necesidad de realizar ensayos más específicos y, por tanto, mínimos.

**Mezcla:** Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

**Sustancias de un solo componente:** Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**Sustancia de componentes múltiples:** Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que hay varios componentes principales presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

▼**M8**

**Testigo positivo:** Réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Pre-haptenos:** Productos que pasan a ser sensibilizantes por una transformación abiótica, p. ej. mediante oxidación.

**Pro-haptenos:** Productos que requieren activación enzimática para ejercer su potencial de sensibilización cutánea.

**Pertinencia:** Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un ensayo (14).

**Fiabilidad:** Medida del grado en que un ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (14).

**Tanda:** Una tanda consta del ensayo de uno o más productos de forma simultánea con un control del disolvente o vehículo y con un testigo positivo.

**Sensibilidad:** Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (14).

**IE:** Índice de estimulación. Valores relativos de la media geométrica de la intensidad de la fluorescencia de las células tratadas con el producto en comparación con las células tratadas con disolvente.

**Control del disolvente o vehículo:** Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, excepto el producto problema, pero incluido el disolvente o vehículo utilizado. Se utiliza para establecer la respuesta de referencia para las muestras tratadas con el producto problema disuelto o disperso de forma estable en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un control del medio en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Especificidad:** Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (14).

**Solución amortiguadora de tinción:** Solución salina amortiguadora de fosfato con un 5 % de suero de ternera fetal.

**Sustancia:** Elemento químico y sus compuestos naturales u obtenidos mediante algún proceso de producción, incluidos los eventuales aditivos necesarios para mantener su estabilidad y las eventuales impurezas que se produzcan en el proceso, con exclusión de los eventuales disolventes que puedan separarse sin afectar a la estabilidad de la sustancia ni modificar su composición;

**Producto problema:** Sustancia o mezcla estudiada con este ensayo.

▼M8

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas):** Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (16).

**UVCB:** Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja o materiales biológicos.

**Ensayo válido:** Ensayo del que se considera que tiene suficiente pertinencia y fiabilidad con un fin específico y que se basa en principios sólidos desde el punto de vista científico. Un ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado (14).

▼**M8**

*Apéndice 2.2*

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA

Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la correcta obtención con el U-SENS™ de la clasificación prevista de las diez sustancias recomendadas en el cuadro 1, y la obtención de valores de CV70 y CE150 que estén dentro del intervalo de referencia respectivo con al menos ocho de las diez sustancias utilizadas para demostrar la competencia. Estas sustancias para demostrar la competencia se han seleccionado a fin de representar la gama de respuestas correspondientes a los peligros de sensibilización cutánea. Otros criterios de selección fueron que las sustancias estén disponibles en el mercado y que se disponga de datos de referencia *in vivo* de alta calidad, así como de datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el ensayo U-SENS™. Asimismo, ha de disponerse de datos de referencia publicados sobre el ensayo U-SENS™ (1) (8).

*Cuadro 1*

**Sustancias recomendadas para demostrar la competencia técnica con el ensayo U-SENS™**

| Sustancias para la competencia | N.º CAS | Estado físico | Asignación *in vivo* (1) | Disolvente/ Vehículo de U-SENS™ | Intervalo de referencia de CV70 en µg/ml (2) de U-SENS™ | Intervalo de referencia de CE150 en µg/ml (2) de U-SENS™ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 4-Fenilendiamina | 106-50-3 | Sólido | Sensibilizante (fuerte) | Medio completo (3) | < 30 | Positivo (≤ 10) |
| Ácido picrilsulfónico | 2508-19-2 | Líquido | Sensibilizante (fuerte) | Medio completo | > 50 | Positivo (≤ 50) |
| Maleato de dietilo | 141-05-9 | Líquido | Sensibilizante (moderado) | DMSO | 10-100 | Positivo (≤ 20) |
| Resorcinol | 108-46-3 | Sólido | Sensibilizante (moderado) | Medio completo | > 100 | Positivo (≤ 50) |
| Alcohol cinámico | 104-54-1 | Sólido | Sensibilizante (débil) | DMSO | > 100 | Positivo (10-100) |
| 4-Alilanisol | 140-67-0 | Líquido | Sensibilizante (débil) | DMSO | > 100 | Positivo (< 200) |
| Sacarina | 81-07-2 | Sólido | No sensibilizante | DMSO | > 200 | Negativo (> 200) |
| Glicerol | 56-81-5 | Líquido | No sensibilizante | Medio completo | > 200 | Negativo (> 200) |
| Ácido láctico | 50-21-5 | Líquido | No sensibilizante | Medio completo | > 200 | Negativo (> 200) |
| Ácido salicílico | 69-72-7 | Sólido | No sensibilizante | DMSO | > 200 | Negativo (> 200) |

Abreviaturas: Nº CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.

(1) La asignación de peligro (y de potencia) *in vivo* se basa en datos del LLNA (8). La potencia *in vivo* se obtiene con los criterios propuestos por ECETOC (17).

(2) Sobre la base de los valores históricos observados (1) (8).

(3) Medio completo: Medio RMPI-1640 complementado con un 10 % de suero de ternera fetal, L-glutamina 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (8).

▼**M8**

*Apéndice 3*

SENSIBILIZACIÓN CUTÁNEA *IN VITRO*: ENSAYO IL-8 LUC

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

1. A diferencia de los ensayos que analizan la expresión de los marcadores de superficie celular, el ensayo IL-8 Luc cuantifica los cambios en la expresión de la IL-8, que es una citocina asociada a la activación de células dendríticas (DC). En la línea celular con el marcador IL-8 derivada de la THP-1 (THP-G8, establecida a partir de la línea celular de la leucemia monocítica aguda humana, THP-1), se mide la expresión de la IL-8 tras la exposición a los sensibilizantes (1). La expresión de la luciferasa se utiliza entonces para ayudar a discriminar entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes.

2. Se ha evaluado el ensayo IL-8 Luc en un estudio de validación (2) realizado por el Centro Japonés para la Validación de Métodos Alternativos (JaCVAM, Japanese Centre for the Validation of Alternatives Methods), el Ministerio de Economía, Comercio e Industria (METI, Ministry of Economy, Trade and Industry) y la Sociedad Japonesa de Alternativas a Experimentos con Animales (JSAAE, Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments) y posteriormente se ha sometido a una revisión independiente por pares (3) bajo los auspicios del JaCVAM y el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar (MHLW), con el apoyo de la Cooperación Internacional sobre Métodos Alternativos de Ensayo (ICATM, International Cooperation on Alternative Test Methods). Teniendo en cuenta todas las pruebas disponibles y las aportaciones de los reguladores y de las partes interesadas, se considera que el ensayo IL-8 Luc es útil como parte de un enfoque IATA para justificar la discriminación entre sensibilizantes y no sensibilizantes a efectos de la clasificación de los peligros y el etiquetado. En la bibliografía se recogen ejemplos del uso de datos del ensayo IL-8 Luc en combinación con otra información (4) (5) (6).

3. El ensayo con IL-8 IL- ha demostrado ser transferible a los laboratorios con experiencia en el cultivo celular y la medición de la luciferasa. Las reproducibilidades dentro de un laboratorio y entre laboratorios eran del 87,7 % y del 87,5 %, respectivamente (2). Los resultados obtenidos en el estudio de validación (2) y otras obras publicadas (1) (6) indican que, frente al LLNA, el ensayo IL-8 Luc consideró que 118 de 143 productos eran positivos o negativos y que 25 productos no eran concluyentes, y que la exactitud del ensayo IL-8 Luc en cuanto a la distinción entre sensibilizantes cutáneos (categoría 1 del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) y no sensibilizantes (sin categoría del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) es del 86 % (101/118) con una sensibilidad del 96 % (92/96) y una especificidad del 41 % (9/22). Excluidas las sustancias que no están en el ámbito de aplicabilidad que se describe más abajo (punto 5), el ensayo IL-8 Luc consideró positivos o negativos 113 de 136 productos y consideró no concluyentes 23 productos, y la exactitud del ensayo IL-8 Luc es del 89 % (101/113), con una sensibilidad del 96 % (92/96) y una especificidad del 53 % (9/17). Utilizando los datos humanos citados en Urbisch *et al.* (7), el ensayo IL-8 Luc consideró positivos o negativos 76 de 90 productos, y consideró no concluyentes 14 productos, y la exactitud es del 80 % (61/76), la sensibilidad es del 93 % (54/58) y la especificidad es del 39 % (7/18). Excluidas las sustancias que no están en el ámbito de aplicabilidad, el ensayo IL-8 Luc consideró positivos o negativos 71 de 84 productos y consideró no concluyentes 13 productos, y la exactitud es del 86 % (61/71), con una sensibilidad del 93 % (54/58) y una especificidad del 54 % (7/13). Es más probable que se den asignaciones negativas falsas con el ensayo IL-8 Luc en relación con los productos que muestran una potencia de sensibilización cutánea baja o moderada (es decir, subcategoría 1B del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) que con los productos que presentan una potencia elevada (es decir, subcategoría 1A del SGA de las Naciones Unidas y del CLP) (6). En conjunto, la información avala la función del ensayo IL-8 Luc para identificar los peligros de sensibilización cutánea. Los valores de la exactitud aquí indicados para el ensayo IL-8 Luc utilizado como ensayo único solo son indicativos, ya que el ensayo debe considerarse en combinación con otras

▼**M8**

fuentes de información en el contexto de un enfoque IATA y de conformidad con las disposiciones de los puntos 7 y 8 de la introducción general. Además, a la hora de evaluar los ensayos de la sensibilización cutánea sin animales, debe tenerse en cuenta que el ensayo LLNA y otros ensayos con animales pueden no reflejar plenamente la situación en los seres humanos.

4. Sobre la base de los datos actualmente disponibles, se ha demostrado que el ensayo IL-8 Luc es aplicable a productos problema que abarcan diversos grupos funcionales orgánicos, mecanismos de reacción, potencias de sensibilización cutánea (determinada en estudios *in vivo*) y propiedades fisicoquímicas (2) (6).

5. Aunque el ensayo IL-8 Luc utiliza X-VIVO™ 15 como disolvente, con él se han evaluado correctamente productos con un log $K_{ow}$ > 3,5 y los que tienen una hidrosolubilidad de alrededor de 100 μg/ml, según lo calculado por el EPI Suite™, y su comportamiento para detectar sensibilizantes con baja hidrosolubilidad es superior al del ensayo IL-8 Luc con dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente (2). Sin embargo, los resultados negativos de los productos problema que no se disuelven a 20 mg/ml pueden ser resultados negativos falsos debido a su incapacidad de disolverse en X-VIVO™ 15. Por tanto, no deben tenerse en cuenta los resultados negativos de estos productos. En el estudio de validación se observó una elevada tasa de falsos resultados negativos. Por otra parte, debido a la limitada capacidad metabólica de la línea celular (8) y a las condiciones experimentales, pueden dar resultados negativos en el ensayo los pro-haptenos (sustancias que requieren activación metabólica) y los pre-haptenos (sustancias activadas por oxidación con el aire). Sin embargo, aunque deben interpretarse con cautela los resultados negativos de posibles pre/pro-haptenos, el ensayo IL-8 Luc ha considerado correctamente 11 de 11 pre-haptenos, 6/6 pro-haptenos y 6/8 pre/pro-haptenos en el conjunto de datos del ensayo con IL-8 Luc (2). Sobre la base de la reciente revisión global de tres ensayos sin animales (el DPRA, el KeratinoSens™ y el h-CLAT) para detectar pre y pro-haptenos (9), y sobre la base del hecho de que las células THP-G8 utilizadas en el ensayo IL-8 Luc son una línea celular derivada de la THP-1 que se utiliza en el ensayo h-CLAT, el ensayo IL-8 Luc puede también contribuir a aumentar la sensibilidad de los ensayos sin animales a fin de detectar pre y pro-haptenos en la combinación de otros ensayos. Los tensioactivos sometidos a ensayo hasta ahora han dado resultados positivos (falsos) independientemente de su tipo (por ejemplo, catiónicos, aniónicos o no iónicos). Por último, los productos que interfieren con la luciferasa pueden confundir su actividad/medición, provocando una mayor luminiscencia o una inhibición aparente (10). Por ejemplo, se ha informado de que unas concentraciones de fitoestrógenos superiores a 1 μM interfieren con las señales de luminiscencia en otros ensayos de luciferasa con gen marcador debido a la sobreactivación del gen marcador de la luciferasa. En consecuencia, debe examinarse detenidamente la expresión de la luciferasa obtenida a altas concentraciones de fitoestrógenos o de compuestos sospechosos de provocar la activación fitoestrogenoide del gen marcador de la luciferasa (11). Sobre la base de lo anterior, los tensioactivos, los anhídridos y los productos que interfieren con la luciferasa quedan fuera del ámbito de aplicación de este ensayo. En los casos en que haya pruebas que demuestren la inaplicabilidad del ensayo IL-8 Luc a otras categorías específicas de productos problema, no deberá utilizarse este ensayo con tales categorías específicas.

6. Tal como se ha descrito anteriormente, el ensayo IL-8 Luc sirve para justificar la discriminación entre los sensibilizantes cutáneos y los no sensibilizantes. Es necesario seguir trabajando, preferiblemente sobre la base de datos humanos, para determinar si los resultados del ensayo IL-8 Luc pueden contribuir a la evaluación de la potencia cuando se considere en combinación con otras fuentes de información.

▼**M8**

7. En el apéndice 3.1 se dan las definiciones pertinentes.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. El ensayo IL-8 Luc hace uso de la línea celular THP-1 de la leucemia monocítica humana, que se obtuvo de la American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.). Utilizando esta línea celular, el Departamento de Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Tohoku, estableció una línea celular con el marcador IL-8 derivada de la THP-1, la THP-G8, que alberga los genes del naranja estable de luciferasa (SLO, *Stable Luciferase Orange*) y del rojo estable de luciferasa (SLR, *Stable Luciferase Red*), bajo el control del promotor de la IL-8 y del de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), respectivamente (1). Esto permite la medición cuantitativa de la inducción del gen de la luciferasa mediante la detección de la luminiscencia a partir de sustratos de luciferasa bien establecidos que emiten luz como indicador de la actividad de la IL-8 y del GAPDH en células tras la exposición a productos sensibilizantes.

9. El sistema de ensayo de doble color incluye una luciferasa que emite luz naranja (SLO; λmáx = 580 nm) (12) correspondiente a la expresión génica del promotor de la IL-8, así como una luciferasa que emite luz roja (SLR; λmáx = 630 nm) (13) correspondiente a la expresión génica del promotor del testigo interno, GAPDH. Las dos luciferasas emiten distintos colores al reaccionar con la D-luciferina de la luciérnaga, y su luminiscencia se mide simultáneamente en una reacción de una sola fase, dividiendo la emisión de la mezcla de ensayo mediante un filtro óptico (14) (apéndice 3.2).

10. Las células THP-G8 se tratan durante 16 horas con el producto problema, tras lo cual se mide la actividad de la luciferasa SLO (SLO-LA), que refleja la actividad del promotor de la IL-8, y la actividad de la luciferasa SLR (SLR-LA), que refleja la actividad del promotor de la GAPDH. Para que las abreviaturas sean fáciles de comprender, SLO-LA y SLR-LA se designan como IL8LA y GAPLA, respectivamente. El cuadro 1 presenta una descripción de los términos asociados a la actividad de la luciferasa en el ensayo IL-8 Luc. Los valores medidos se utilizan para calcular el valor normalizado de IL8LA (nIL8LA), que es la relación entre IL8LA y GAPLA; el factor de inducción de nIL8LA (Ind-IL8LA), que es la relación entre las medias aritméticas de los valores cuádruples medidos de la nIL8LA en las células THP-G8 tratadas con un producto problema y los valores de la nIL8LA de células THP-G8 sin tratar; y la inhibición de la GAPLA (Inh-GAPLA), que es la relación entre las medias aritméticas de los valores cuádruples medidos de la GAPLA en las células THP-G8 tratadas con un producto problema y los valores de la GAPLA de células THP-G8 sin tratar, y que se utiliza como indicador de la citotoxicidad.

*Cuadro 1*

**Descripción de los términos asociados a la actividad de la luciferasa en el ensayo IL-8 Luc**

| Abreviaturas | Definición |
|---|---|
| GAPLA | Actividad de la luciferasa SLR que refleja la actividad del promotor de la GAPDH |
| IL8LA | Actividad de la luciferasa SLO que refleja la actividad del promotor de la IL-8 |
| nIL8LA | IL8LA/GAPLA |
| Ind-IL8LA | nIL8LA de células THP-G8 tratadas con productos / nIL8LA de células sin tratar |

▼**M8**

| Abreviaturas | Definición |
|---|---|
| Inh-GAPLA | GAPLA de células THP-G8 tratadas con productos / GAPLA de células sin tratar |
| CV05 | Concentración más baja del producto a la que el valor de Inh-GAPLA se hace < 0,05. |

11. Se dispone de normas de comportamiento (NC) (15) para facilitar la validación de ensayos de la luciferasa IL-8 *in vitro* modificados similares al ensayo IL-8 Luc y que tienen en cuenta la modificación oportuna de las directrices de ensayo 442E de la OCDE para su inclusión. Solo se garantizará la aceptación mutua de datos de la OCDE (MAD, *Mutual Acceptance of Data*) respecto a los ensayos validados con arreglo a las NC, si estos ensayos han sido revisados e incluidos en las directrices de ensayo 442E por la OCDE (16).

DEMOSTRACIÓN DE LA COMPETENCIA

12. Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método de ensayo B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica, utilizando las diez sustancias para la prueba de la competencia que figuran en el apéndice 3.3, de conformidad con las buenas prácticas de los métodos *in vitro* (17). Por otra parte, los usuarios del ensayo deben mantener una base de datos históricos que contenga los generados en los controles de reactividad (véase el punto 15) y con los testigos positivos y los controles del disolvente o vehículo (véanse los puntos 21-24), y utilizar estos datos para confirmar que la reproducibilidad del ensayo en su laboratorio se mantiene a lo largo del tiempo.

PROCEDIMIENTO

13. Está disponible el procedimiento normalizado de trabajo (PNT) para el ensayo IL-8 Luc y debe utilizarse al realizar el ensayo (18). Los laboratorios dispuestos a realizar el ensayo pueden obtener la línea celular THP-G8 recombinante de la empresa CPG Lab. Co. Ltd., Tottori, Japón, previa firma de un acuerdo de transferencia de material (MTA) segúnlas condiciones del modelo de la OCDE. En los puntos siguientes se recoge una descripción de los principales componentes y procedimientos del ensayo.

**Preparación de las células**

14. La línea celular THP-G8 de GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japón, es la que debe utilizarse para realizar el ensayo IL-8 Luc (véanse los puntos 8 y 13). Una vez recibidas, las células se propagan (2-4 pases) y se conservan congeladas como una población homogénea. Las células de esta población pueden propagarse hasta un máximo de 12 pases o un máximo de 6 semanas. El medio utilizado para la propagación es el medio de cultivo RPMI-1640 que contiene un 10 % de suero bovino fetal (FBS), solución antibiótica/antimicótica (100 U/ml de penicilina G, 100 µg/ml de estreptomicina y 0,25 µg/ml de anfotericina B en una solución salina del 0,85 %) (p. ej., GIBCO Cat # 15240-062), 0,15 µg/ml de puromicina (p. ej., n.º CAS 58-58-2) y 300 µg/ml de G418 (p. ej., n.º CAS 108321-42-2).

15. Antes de utilizarse para el ensayo, las células deben ser objeto de un control de reactividad. Este control debe realizarse 1-2 semanas o 2-4 pases después de la descongelación, utilizando el testigo positivo, el bromuro de 4-nitrobencilo (4-NBB) (n.º CAS 100-11-8, ≥ 99 % de pureza) y el testigo negativo, el ácido láctico (LA) (n.º CAS 50-21-5, ≥ 85 % de pureza). El 4-NBB debe producir una respuesta positiva de Ind-IL8LA (≥ 1,4), mientras que el LA debe dar una respuesta negativa de Ind-IL8LA (< 1,4). Solo se pueden utilizar para el ensayo las células que hayan superado el control de reactividad. Este control debe realizarse con arreglo a los procedimientos descritos en los puntos 22 a 24.

▼M8

16. Para el ensayo, se siembran células THP-G8 a una densidad de 2-5 × $10^5$ células/ml, y se precultivan en matraces de cultivo durante 48-96 horas. El día del ensayo, se lavan las células recolectadas del matraz de cultivo utilizando RPMI-1640 con un 10 % de FBS sin antibióticos y, a continuación, se vuelven a suspender con RPMI-1640 con un 10 % de FBS sin antibióticos a la densidad de 1 × $10^6$ células/ml. A continuación, se distribuyen las células en una placa negra de fondo plano de 96 pocillos (p. ej., Costar Cat#3603) a razón de 50 µl (5 × $10^4$ células) por pocillo.

**Preparación del producto problema y de las sustancias testigo**

17. El producto problema y las sustancias testigo se preparan el día del ensayo. Para el ensayo IL-8 Luc, los productos problema se disuelven en X-VIVO™ 15, un medio exento de suero disponible en el mercado (Lonza, 04-418Q), hasta la concentración final de 20 mg/ml. Se añade X-VIVO™ 15 a 20 mg de producto problema (con independencia de la solubilidad del producto) en un tubo de microcentrifugadora, y se lleva al volumen de 1 ml; a continuación se mezcla enérgicamente en vórtex y se agita en un rotor a una velocidad máxima de 8 rpm durante 30 minutos a una temperatura ambiente de unos 20ºC. Además, si los productos sólidos siguen sin disolverse, el tubo se somete a ultrasonidos hasta que el producto se disuelve totalmente o se dispersa de forma estable. En el caso de productos problema solubles en X-VIVO™ 15, la solución se diluye por un factor de 5 con X-VIVO™ 15 y se utiliza como solución madre del producto problema en X-VIVO™ 15 (4 mg/ml). En el caso de productos problema insolubles en X-VIVO™ 15, la mezcla se pone en rotación de nuevo durante al menos 30 minutos, y se centrifuga después a 15000 rpm (≈ 20000 g) durante 5 min. El sobrenadante resultante se utiliza como solución madre del producto problema en X-VIVO™ 15. Debe aportarse una justificación científica del uso de otros disolventes, como el DMSO, el agua o el medio de cultivo. El procedimiento detallado para la disolución de productos figura en el apéndice 3.5. Las soluciones en X-VIVO™ 15 descritas en los puntos 18-23 se mezclan 1: 1 (v/v) con las suspensiones celulares preparadas en la placa negra de fondo plano de 96 pocillos (véase el punto 16).

18. La primera tanda del ensayo tiene por objeto determinar la concentración citotóxica y examinar el potencial de sensibilización cutánea de los productos. Utilizando el X-VIVO™ 15, se hacen diluciones en serie de las soluciones madre de los productos problema en X- VIVO™ 15, con un factor de dilución de dos (véase el apéndice 3.5) utilizando un bloque de ensayo de 96 pocillos (p. ej., Costar Cat # EW-01729-03). A continuación, se añaden 50 µl/pocillo de la solución diluida a 50 µl de la suspensión celular en una placa negra de fondo plano de 96 pocillos. Por lo tanto, en el caso de los productos problema solubles en X-VIVO™ 15, las concentraciones finales de los productos problema van de 0,002 a 2 mg/ml (apéndice 3.5). En el caso de los productos problema que no son solubles en X-VIVO™ 15 a la concentración de 20 mg/ml, solo se determinan los factores de dilución que van de 2 a $2^{10}$, si bien las concentraciones finales reales de los productos problema siguen siendo inciertas y dependen de la concentración saturada de los productos problema en la solución madre en X-VIVO™ 15.

19. En tandas de ensayo posteriores (es decir, las réplicas segunda, tercera y cuarta), la solución madre de X-VIVO™ 15 se hará a una concentración 4 veces superior a la concentración de viabilidad celular 05 (CV05, concentración más baja a la que el valor de Inh-GAPLA se hace < 0,05) del primer experimento. Si el valor de Inh-GAPLA no se reduce por debajo de 0,05 con la concentración más elevada en la primera tanda, la solución madre en X-VIVO™ 15 se hace a la concentración más alta de la primera tanda. La concentración CV05 se calcula dividiendo la concentración de la solución madre en la primera tanda por el primer factor de dilución correspondiente a CV05 (X) [factor de dilución CV05 (X), que es el factor de dilución necesario para diluir la solución madre hasta CV05] (véase el apéndice 3.5). En el caso de sustancias problema insolubles en X-VIVO a 20 mg/ml, el valor de CV05 se determina mediante la concentración de la solución madre × 1/X. En las tandas 2 a 4, se prepara una segunda solución madre a 4 × CV05 (apéndice 3.5).

▼**M8**

20. De las segundas soluciones madre en X-VIVO™ 15 se realizan diluciones en serie con un factor de dilución de 1,5 utilizando un bloque de ensayo de 96 pocillos. A continuación, se añaden 50 µl/pocillo de la solución diluida a 50 µl de la suspensión celular en los pocillos de una placa negra de fondo plano de 96 pocillos. Cada concentración de cada producto problema debe ensayarse en 4 pocillos. A continuación, las muestras se mezclan con un agitador de placas y se incuban durante 16 horas a 37°C y con 5 % de $CO_2$, tras lo cual se mide la actividad de la luciferasa como se describe a continuación.

21. El control del disolvente es la mezcla de 50 µl/pocillo de X-VIVO™ 15 y de 50 µl/pocillo de suspensión celular en RPMI-1640 con un 10 % de FBS.

22. El testigo positivo recomendado es el 4-NBB. Se preparan 20 mg de 4-NBB en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml, al que se añade X-VIVO™ 15 hasta completar 1 ml. Se mezcla enérgicamente en vórtex el contenido del tubo y se agita en un rotor a la velocidad máxima de 8 rpm durante al menos 30 minutos. Tras la centrifugación a 20000 g durante 5 min, el sobrenadante se diluye por un factor de 4 con X-VIVO™ 15, y se transfieren 500 µl del sobrenadante diluido a un pocillo de un bloque de ensayo de 96 pocillos. El sobrenadante diluido se diluye más con X-VIVO™ 15 por factores de 2 y 4, y se añaden 50 µl de la solución a 50 µl de la suspensión de células THP-G8 en los pocillos de una placa negra de fondo plano de 96 pocillos (apéndice 3.6). Cada concentración del testigo positivo debe ensayarse en 4 pocillos. La placa se agita en un agitador de placas y se incuba en una incubadora de $CO_2$ durante 16 horas (37°C, 5 % de $CO_2$), tras lo cual se mide la actividad de la luciferasa como se describe en el punto 29.

23. El testigo negativo recomendado es el LA. Se preparan 20 mg de este en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml, al que se añade X-VIVO™ 15 hasta completar 1 ml (20 mg/ ml). Una solución de 20 mg/ml de solución de LA se diluye por un factor de 5 con X-VIVO™ 15 (4 mg/ml); se transfieren 500 µl de esta solución de LA de 4 mg/ml a un pocillo de un bloque de ensayo de 96 pocillos. Esta solución se diluye por un factor de 2 con X-VIVO™ 15 y después se diluye de nuevo por un factor de 2 para producir soluciones de 2 mg/ml y 1 mg/ml. Se añaden 50 µl de estas 3 soluciones y el control del vehículo (X-VIVO™ 15) a 50 µl de suspensión de células THP-G8 en los pocillos de una placa negra de fondo plano de 96 pocillos. Cada concentración del testigo negativo debe ensayarse en 4 pocillos. La placa se agita en un agitador de placas y se incuba en una incubadora de $CO_2$ durante 16 horas (37°C, 5 % de $CO_2$), tras lo cual se mide la actividad de la luciferasa como se describe en el punto 29.

24. Podrán utilizarse otros testigos positivos o negativos adecuados si se dispone de datos históricos para obtener criterios comparables de aceptación de tandas.

25. Deben tomarse precauciones para evitar la evaporación de los productos problema volátiles y la contaminación cruzada entre pocillos por productos problema, por ejemplo tapando la placa antes de la incubación con los productos problema.

26. Los productos problema y el control de disolvente requieren de 2 a 4 tandas para obtener una asignación positiva o negativa (véase el cuadro 2). Cada tanda se realiza un día diferente con nueva solución madre de los productos problema en X-VIVO™ 15 y células recolectadas de forma independiente. Las células pueden proceder del mismo pase.

▼M8

**Mediciones de la actividad de la luciferasa**

27. La luminiscencia se mide mediante un luminómetro de microplacas de 96 pocillos, equipado con filtros ópticos, como, p. ej., Phios (ATTO, Tokio, Japón), Tristan 941 (Berthold, Bad Wildbad, Alemania) y la serie ARVO (PerkinElmer, Waltham, MA, EE. UU.). El luminómetro deberá calibrarse para cada ensayo, a fin de garantizar la reproducibilidad (19). Para esta calibración se dispone de luciferasas recombinantes que emiten luz de color naranja y rojo.

28. A cada pocillo de la placa que contenga la suspensión celular tratada con o sin producto se transfieren 100 µl del reactivo precalentado de ensayo de la luciferasa Tripluc® (Tripluc). Se agita la placa durante 10 minutos a una temperatura ambiente de 20ºC aproximadamente. La placa se coloca en el luminómetro para medir la actividad de la luciferasa. Se mide la bioluminiscencia durante 3 segundos tanto en ausencia (F0) como en presencia (F1) del filtro óptico. Debe justificarse el uso de otras condiciones, por ejemplo en función del modelo de luminómetro utilizado.

29. Los parámetros de cada concentración se calculan a partir de los valores medidos, por ejemplo IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA, Inh-GAPLA, la media ± DT de IL8LA, la media ± DT de GAPLA, la media ± DT de nIL8LA, la media ± DT de Ind-IL8LA, la media ± DT de Inh-GAPLA, y el intervalo de confianza del 95 % de Ind-IL8LA. Las definiciones de los parámetros utilizados en este punto figuran en los apéndices 3.1 y 3.4.

30. Antes de proceder a la medición, la discriminación del color en los ensayos con marcadores multicolor se consigue generalmente utilizando detectores (luminómetro y lector de placas) equipados con filtros ópticos, tales como filtros de corte agudo (de paso largo o de paso corto) o filtros de paso de banda. Los coeficientes de transmisión de los filtros para cada color de la señal de luminiscencia deben calibrarse antes del ensayo, según el apéndice 3.2.

DATOS E INFORME

**Evaluación de los datos**

31. Los criterios para una decisión positiva o negativa exigen que, en cada una de las fases:

— se considere positiva una asignación del ensayo IL-8 Luc si un producto problema tiene un Ind-IL8LA $\geq$ 1,4 y el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % del Ind-IL8LA $\geq$ 1,0;

— se considere negativa una asignación del ensayo IL-8 Luc si un producto problema tiene un Ind-IL8LA < 1,4 y/o el límite inferior del intervalo de confianza del 95 % de Ind-IL8LA < 1,0.

**Modelo de asignación**

32. Los productos problema que proporcionan dos resultados positivos de entre las tandas primera, segunda, tercera o cuarta se identifican como positivos, mientras que los que dan tres resultados negativos de entre las tandas primera, segunda, tercera o cuarta se identifican como supuestos negativos (cuadro 2). Entre los productos supuestos negativos, los productos que se disuelven a la concentración de 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 se consideran negativos, mientras que los productos que no se disuelven a la concentración de 20 mg/ml de X-VIVO™ 15 no deben tenerse en cuenta (figura 1).

▼M8

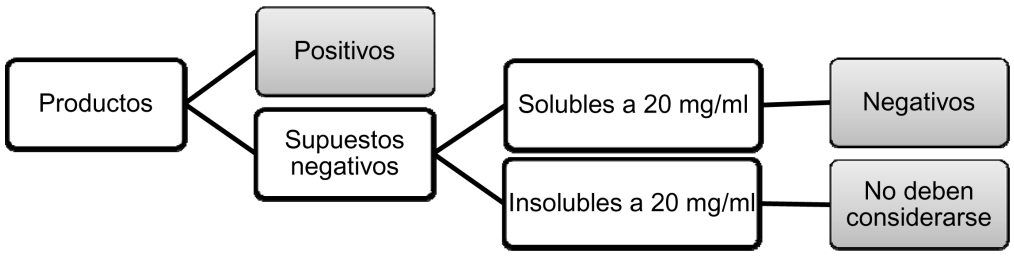
*Cuadro 2*

**Criterios para identificar positivos y supuestos negativos**

| 1.ª tanda | 2.ª tanda | 3.ª tanda | 4.ª tanda | Clasificación final |
|---|---|---|---|---|
| Positivo | Positivo | – | – | Positivo |
| | Negativo | Positivo | – | Positivo |
| | | Negativo | Positivo | Positivo |
| | | | Negativo | Supuesto negativo |
| Negativo | Positivo | Positivo | – | Positivo |
| | | Negativo | Positivo | Positivo |
| | | | Negativo | Supuesto negativo |
| | Negativo | Positivo | Positivo | Positivo |
| | | | Negativo | Supuesto negativo |
| | | Negativo | – | Supuesto negativo |

*Figura 1*

**Modelo de asignación para la decisión final**




**Criterios de aceptación**

33. Deben cumplirse los siguientes criterios de aceptación cuando se use el ensayo IL-8 Luc.

— El valor de Ind-IL8LA debe ser superior a 5,0 a al menos una concentración del testigo positivo, 4-NBB, en cada tanda.

— El valor de Ind-IL8LA debe ser inferior a 1,4 a cualquier concentración del testigo negativo, ácido láctico, en cada tanda.

— Deben rechazarse los datos de las placas en las que la GAPLA de los pocillos testigo con células y Tripluc pero sin productos sea inferior a 5 veces la de los pocillos con solo medio de ensayo (50 µl/pocillo de RPMI-1640 con un 10 % de FBS y 50 µl/pocillo de X-VIVO™ 15).

— Deben rechazarse los datos de las placas en las que la Inh-GAPLA de todas las concentraciones de los productos problema o testigo sea inferior a 0,05. En este caso, debe repetirse el primer ensayo de manera que la concentración final más alta del ensayo repetido sea la concentración final más baja del ensayo anterior.

▼M8

**Informe del ensayo**

34. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Productos problema*

Sustancias de un solo componente:

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Solubilidad en X-VIVO$^{TM}$ 15. En el caso de los productos que sean insolubles en X-VIVO$^{TM}$ 15, si se observa precipitación o flotación después de la centrifugación;

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema si no se ha utilizado X-VIVO$^{TM}$ 15.

Sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas:

— Caracterización, en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química (véase más arriba), pureza, presencia cuantitativa y propiedades fisicoquímicas pertinentes de los componentes (véase más arriba), en la medida de lo posible;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible;

— Peso molecular o peso molecular aparente en el caso de mezclas/polímeros de composición conocida u otra información pertinente para la realización del estudio;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Solubilidad en X-VIVO$^{TM}$ 15. En el caso de los productos que sean insolubles en X-VIVO$^{TM}$ 15, si se observa precipitación o flotación después de la centrifugación;

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible.

— Justificación de la elección del disolvente o vehículo para cada producto problema si no se ha utilizado X-VIVO$^{TM}$ 15.

*Testigos*

Testigo positivo:

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, y/u otros identificadores;

— Aspecto físico, hidrosolubilidad, peso molecular, y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes, en la medida de lo posible y en los casos aplicables;

▼**M8**

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Tratamiento antes del ensayo, en su caso (p. ej., calentamiento, trituración);

— Concentración o concentraciones estudiadas;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Referencia a los resultados de los testigos positivos históricos que demuestren unos criterios adecuados de aceptación, si procede.

Testigo negativo:

— Identificación química, como nombre o nombres IUPAC o CAS, número o números CAS, y/u otros identificadores;

— Pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc.;

— Aspecto físico, peso molecular, y propiedades fisicoquímicas pertinentes adicionales en el caso de que se utilicen unos testigos negativos distintos de los especificados en las directrices del ensayo y en la medida de lo posible;

— Condiciones de conservación y estabilidad en la medida de lo posible;

— Justificación de la elección del disolvente para cada producto problema.

*Condiciones de ensayo*

— Nombre y dirección del promotor, laboratorio y director del estudio;

— Descripción del ensayo utilizado;

— Línea celular utilizada, sus condiciones de conservación y su origen (por ejemplo, laboratorio donde se ha obtenido);

— Número de lote y origen del FBS, nombre del proveedor, número de lote de la placa negra de fondo plano de 96 pocillos y número de lote del reactivo Tripluc;

— Número de pases y densidad celular utilizados para el ensayo;

— Método de recuento de células utilizado para la siembra antes del ensayo, y medidas adoptadas para garantizar la homogeneidad de la distribución del número de células;

— Luminómetro utilizado (por ejemplo, modelo), incluidos los ajustes instrumentales, sustrato de luciferasa utilizado, y demostración de las mediciones adecuadas de luminiscencia sobre la base del ensayo de control descrito en el apéndice 3.2;

— Procedimiento utilizado para demostrar la competencia del laboratorio en cuanto a la realización del ensayo (por ejemplo, mediante el ensayo de sustancias de la prueba de la competencia) o para demostrar que el ensayo tiene un comportamiento reproducible a lo largo del tiempo.

*Procedimiento de ensayo*

— Número de réplicas y de tandas efectuadas;

— Concentraciones del producto problema, procedimiento de aplicación y tiempo de exposición (si son diferentes de los recomendados);

▼**M8**

— Descripción de los criterios de evaluación y decisión seguidos;

— Descripción de los criterios de aceptación del estudio seguidos;

— Descripción de las eventuales modificaciones del procedimiento del ensayo.

*Resultados*

— Mediciones de IL8LA y GAPLA;

— Cálculos de nIL8LA, Ind-IL8LA e Inh-GAPLA;

— Intervalo de confianza del 95 % de Ind-IL8LA;

— Gráfico que muestre las curvas dosis-respuesta en cuanto a la inducción de la actividad de la luciferasa y la viabilidad;

— Descripción de cualesquiera otras observaciones pertinentes, si procede.

*Discusión de los resultados*

— Discusión de los resultados obtenidos con el ensayo IL-8 Luc;

— Consideración de los resultados del ensayo en el contexto de un enfoque IATA, si se dispone de otra información pertinente.

*Conclusión*

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, and Aiba S. (2011). An *in vitro* test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. Toxicol Sci 124:359-69.

(2) OCDE (2017). Validation report for the international validation study on the IL-8 Luc assay as a test evaluating the skin sensitizing potential of chemicals conducted by the IL-8 Luc Assay. Series on Testing and Assessment No 267, ENV/JM/MONO(2017)19. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(3) OCDE (2017). Report of the Peer Review Panel for the IL-8 Luciferase (IL-8 Luc) Assay for *in vitro* skin sensitisation. Series on Testing and Assessment No 258, ENV/JM/MONO(2017)20. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(4) OCDE (2016). Guidance Document On The Reporting Of Defined Approaches And Individual Information Sources To Be Used Within Integrated Approaches To Testing And Assessment (IATA) For Skin Sensitisation, Series on Testing & Assessment No 256, ENV/JM/MONO(2016)29. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm.

(5) van der Veen JW, Rorije E, Emter R, Natsch A, van Loveren H, and Ezendam J. (2014). Evaluating the performance of integrated approaches for hazard identification of skin sensitizing chemicals. Regul Toxicol Pharmacol 69:371-9.

(6) Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Nakajima Y, Ohmiya Y, and Aiba S. (2015). Optimization of the IL-8 Luc assay as an *in vitro* test for skin sensitization. Toxicol *In Vitro* 29:1816-30.

▼**M8**

(7) Urbisch D, Mehling A, Guth K, Ramirez T, Honarvar N, Kolle S, Landsiedel R, Jaworska J, Kern PS, Gerberick F, et al. (2015). Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods. Regul Toxicol Pharmacol 71:337-51.

(8) Ashikaga T, Sakaguchi H, Sono S, Kosaka N, Ishikawa M, Nukada Y, Miyazawa M, Ito Y, Nishiyama N, and Itagaki H. (2010). A comparative evaluation of *in vitro* skin sensitisation tests: the human cell-line activation test (h-CLAT) versus the local lymph node assay (LLNA). Alternatives to laboratory animals: ATLA 38:275-84.

(9) Patlewicz G, Casati S, Basketter DA, Asturiol D, Roberts DW, Lepoittevin J-P, Worth A and Aschberger K (2016) Can currently available non-animal methods detect pre and pro haptens relevant for skin sensitisation? Regul Toxicol Pharmacol, 82:147-155.

(10) Thorne N, Inglese J, and Auld DS. (2010). Illuminating insights into firefly luciferase and other bioluminescent reporters used in chemical biology. Chem Biol 17:646-57.

(11) OCDE (2016). Test No 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, Publicaciones de la OCDE, París. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1787/9789264265295-en.

(12) Viviani V, Uchida A, Suenaga N, Ryufuku M, and Ohmiya Y. (2001). Thr226 is a key residue for bioluminescence spectra determination in beetle luciferases. Biochem Biophys Res Commun 280:1286-91.

(13) Viviani VR, Bechara EJ, and Ohmiya Y. (1999). Cloning, sequence analysis, and expression of active Phrixothrix railroad-worms luciferases: relationship between bioluminescence spectra and primary structures. Biochemistry 38:8271-9.

(14) Nakajima Y, Kimura T, Sugata K, Enomoto T, Asakawa A, Kubota H, Ikeda M, and Ohmiya Y. (2005). Multicolor luciferase assay system: one-step monitoring of multiple gene expressions with a single substrate. Biotechniques 38:891-4.

(15) OCDE (2017). To be published - Performance Standards for the assessment of proposed similar or modified *in vitro* skin sensitisation IL-8 luc test methods. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. OCDE, París, Francia.

(16) OCDE (2005). Guidance Document the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment. OECD Environment, Health and Safety publications, OECD Series on Testing and Assessment No 34. OCDE, París, Francia.

(17) OCDE (2018). Draft Guidance document: Good *In Vitro* Method Practices (GIVIMP) for the Development and Implementation of *In Vitro* Methods for Regulatory Use in Human Safety Assessment. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París. Disponible en: http://www.oecd.org/env/ehs/testing/OECD Final Draft GIVIMP.pdf.

(18) JaCVAM (2016). IL-8 Luc assay protocol, Disponible en: http://www.jacvam.jp/en_effort/effort02.html.

(19) Niwa K, Ichino Y, Kumata S, Nakajima Y, Hiraishi Y, Kato D, Viviani VR, and Ohmiya Y. (2010). Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferases. Photochem Photobiol 86:1046-9.

▼**M8**

(20) OCDE (2012). The Adverse Outcome Pathway for Skin Sensitisation Initiated by Covalent Binding to Proteins, Part 1: Scientific Evidence. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 168. OCDE, París, Francia.

(21) Naciones Unidas (2015). Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos (SGA). Sexta edición revisada. Nueva York & Ginebra: Publicaciones de las Naciones Unidas. ISBN: 978-92-1-117006-1. Disponible en: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev05/05files_s.html

▼**M8**

*Apéndice 3.1*

DEFINICIONES

**Exactitud:** Grado de coincidencia entre los resultados del ensayo y los valores de referencia aceptados. Se trata de una medida del comportamiento del ensayo y es un aspecto de su pertinencia. Este término y el de concordancia se suelen usar indistintamente para indicar la proporción de resultados correctos de un ensayo (16).

**Ruta de resultados adversos (AOP, *Adverse Outcome Pathway*):** Secuencia de fenómenos desde la estructura química de un producto diana o grupo de productos similares, pasando por el fenómeno molecular desencadenante, hasta un resultado *in vivo* de interés (20).

**Producto:** Sustancia o mezcla.

**CV05:** Viabilidad celular 05, es decir, concentración mínima a la que los productos muestran un valor de Inh-GAPLA inferior a 0,05.

**FInSLO-LA:** Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la Ind-IL8LA. Véase la definición de Ind-IL8LA.

**GAPLA:** Actividad de luciferasa del rojo estable de luciferasa (SLR) (λmáx = 630 nm), regulada por el promotor de la GAPDH y que demuestra la viabilidad celular y el número de células viables.

**Peligro:** Propiedad inherente de un agente o situación que tiene capacidad para provocar efectos adversos cuando un organismo, sistema o (sub)población se expone a dicho agente.

**IATA (Enfoque integrado de pruebas y evaluación, *Integrated Approach to Testing and Assessment*):** Enfoque estructurado para la identificación del peligro (potencial), caracterización del peligro (potencia) o evaluación de la seguridad (potencial/potencia y exposición) de un producto o grupo de productos, que integra y pondera de forma estratégica todos los datos pertinentes para fundamentar una decisión normativa relativa a posibles peligros o riesgos o a la necesidad de realizar ensayos más específicos y, por tanto, mínimos.

**II-SLR-LA:** Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la Inh-GAPLA. Véase la definición de Inh-GAPLA.

**IL-8 (interleucina-8):** Citocina derivada de células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, macrófagos y monocitos que provoca quimiotaxia de neutrófilos y linfocitos T.

**IL8LA:** Actividad de la luciferasa del naranja estable de luciferasa (SLO) (λmáx = 580 nm), regulada por el promotor de la IL-8.

**Ind-IL8LA:** Factor multiplicador de la nIL8LA. Se obtiene dividiendo el valor de la nIL8LA de las células THP-G8 tratadas con los productos por el valor de la de las células THP-G8 no estimuladas y representa la inducción de la actividad del promotor de la IL-8 por los productos.

**Inh-GAPLA:** Inhibición de la GAPLA. Se obtiene dividiendo el valor de la GAPLA de las células THP-G8 tratadas con productos por el de la GAPLA de THP-G8 no tratadas y representa la citotoxicidad de los productos.

**Umbral mínimo de inducción (MIT):** Concentración más baja a la que un producto cumple los criterios positivos.

▼M8

**Mezcla:** Mezcla o solución compuesta de dos o más sustancias.

**Sustancia de un solo componente:** Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que un solo componente principal representa al menos el 80 % (p/p).

**Sustancia de componentes múltiples:** Sustancia, definida por su composición cuantitativa, en la que más de uno de los componentes principales están presentes a una concentración ≥ 10 % (p/p) y < 80 % (p/p). Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de un proceso de fabricación. La diferencia entre mezcla y sustancia de componentes múltiples es que una mezcla se obtiene mezclando dos o más sustancias sin reacción química. Una sustancia de componentes múltiples es el resultado de una reacción química.

**nIL8LA:** Actividad de la luciferasa SLO que refleja la actividad del promotor de la IL-8 (IL8LA), normalizada por la actividad de la luciferasa SLR, que refleja la actividad del promotor de la GAPDH (GAPLA). Representa la actividad del promotor de la IL-8 tras considerar la viabilidad celular o el número de células.

**nSLO-LA:** Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la nIL8LA. Véase la definición de nIL8LA.

**Testigo positivo:** Réplica que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo y que se trata con una sustancia de la que se sabe que induce una respuesta positiva. Para asegurar la posibilidad de evaluar la variabilidad de las respuestas del testigo positivo a lo largo del tiempo, no debe ser excesiva la magnitud de la respuesta positiva.

**Pre-haptenos:** Productos que pasan a ser sensibilizantes por una transformación abiótica.

**Pro-haptenos:** Productos que requieren activación enzimática para ejercer su potencial de sensibilización cutánea.

**Pertinencia:** Descripción de la relación del ensayo con el efecto de interés y de si es significativo y útil para un objetivo concreto. Es el grado en que el ensayo mide o predice correctamente el efecto biológico de interés. La pertinencia incorpora la consideración de la exactitud (concordancia) de un ensayo (16).

**Fiabilidad:** Medida del grado en que un ensayo puede aplicarse de forma reproducible a lo largo del tiempo, en un mismo laboratorio y en distintos laboratorios, utilizando el mismo protocolo. Se evalúa calculando la reproducibilidad intra e interlaboratorios y la repetibilidad intralaboratorios (16).

**Tanda:** Una tanda consta del ensayo de uno o más productos de forma simultánea con un control del disolvente o vehículo y con un testigo positivo.

**Sensibilidad:** Proporción de todos los productos activos/positivos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (16).

**SLO-LA:** Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la IL8LA. Véase la definición de IL8LA.

**SLR-LA:** Abreviatura utilizada en el informe de validación y en publicaciones anteriores en relación con el ensayo IL-8 Luc para referirse a la GAPLA. Véase la definición de GAPLA.

▼M8

**Control del disolvente o vehículo:** Muestra no tratada que contiene todos los componentes de un sistema de ensayo, excepto el producto problema, pero incluido el disolvente o vehículo utilizado. Se utiliza para establecer la respuesta de referencia para las muestras tratadas con el producto problema disuelto o disperso de forma estable en el mismo disolvente o vehículo. Cuando se somete a ensayo con un control de medio en paralelo, esta muestra pone de manifiesto también si el disolvente o vehículo interactúa con el sistema de ensayo.

**Especificidad:** Proporción de todos los productos inactivos/negativos que se clasifican correctamente mediante el ensayo. Es una medida de la exactitud de un ensayo que produce resultados categoriales, y un factor importante en la evaluación de la pertinencia de un ensayo (16).

**Sustancia:** Elementos químicos y sus compuestos en estado natural u obtenidos mediante cualquier proceso de producción, incluidos los aditivos necesarios para mantener la estabilidad del producto y las eventuales impurezas derivadas del proceso empleado, pero excluidos los disolventes que se puedan separar sin influir en la estabilidad de la sustancia ni cambiar su composición.

**Tensioactivo:** También denominado agente tensioactivo, es una sustancia, como un detergente, que puede reducir la tensión superficial de un líquido y, de este modo, permitir que forme espuma o penetre en los sólidos. También se conoce como agente humectante (TG437).

**Producto problema:** Sustancia o mezcla estudiada con este método.

**THP-G8:** Línea celular con el marcador IL-8 utilizada en el ensayo IL-8 Luc. La línea celular humana THP-1, similar a los macrófagos, fue transinfectada con los genes de la luciferasa SLO y SLR bajo el control de los promotores de la IL-8 y de la GAPDH, respectivamente.

**Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos de las Naciones Unidas (SGA de las Naciones Unidas):** Sistema que propone la clasificación de los productos (sustancias y mezclas) según tipos y niveles normalizados de peligros físicos, sanitarios y ambientales, y que hace referencia a los elementos correspondientes de comunicación, como pictogramas, palabras de advertencia, indicaciones de peligro, consejos de prudencia, y fichas de datos de seguridad, a efectos de proporcionar información sobre sus efectos adversos con el fin de proteger a la población (incluidos empresarios, trabajadores, transportistas, consumidores y personal de protección civil) y al medio ambiente (21).

**UVCB:** Sustancias de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja o materiales biológicos.

**Método de ensayo válido:** Ensayo del que se considera que tiene suficiente pertinencia y fiabilidad con un fin específico y que se basa en principios sólidos desde el punto de vista científico. Un ensayo nunca es válido en un sentido absoluto, sino únicamente en relación con un fin determinado.

▼**M8**

*Apéndice 3.2*

PRINCIPIO DE LA MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA LUCIFERASA Y DETERMINACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE TRANSMISIÓN DEL FILTRO ÓPTICO RESPECTO A SLO Y SLR

El sistema de ensayo multimarcador (Tripluc) puede utilizarse con un luminómetro de microplacas con un sistema de detección multicolor que puede combinarse con un filtro óptico [por ejemplo, Phelios AB-2350 (ATTO), ARVO (PerkinElmer), Tristar LB941 (Berthold)]. El filtro óptico utilizado en la medición es un filtro de paso largo o corto de 600-620 nm o un filtro de paso de banda de 600-700 nm.

**Medición de luciferasas de dos colores con un filtro óptico.**

En el ejemplo aquí presentado se utiliza Phelios AB-2350 (ATTO). Este luminómetro está equipado con un filtro de paso largo (LP, *long pass*) de 600 nm (R60 HOYA Co., 600 nm LP, Filtro 1) para separar la luminiscencia SLO (λmáx = 580 nm) de la SLR (λmáx = 630 nm).

Para determinar los coeficientes de transmisión del LP de 600 nm, primero, utilizando enzimas luciferasa SLO y SLR purificadas, ha de medirse: i) la intensidad de la bioluminiscencia SLO y SLR sin filtro (F0), ii) la intensidad de la bioluminiscencia SLO y SLR que ha pasado por el LP de 600 nm (filtro 1), y iii) calcular los coeficientes de transmisión del LP de 600 nm respecto a SLO y SLR que se recogen más abajo.

| Transmission coefficients | | Abbreviation | Definition |
|---|---|---|---|
| SLO | Filter 1 Transmission coefficients | $=\kappa O_{R60}$ | The filter's transmission coefficient for the SLO |
| SLR | Filter 1 Transmission coefficients | $\kappa R_{R60}$ | The filter's transmission coefficient for the SLR |

Si las intensidades de SLO y SLR en la muestra problema se expresan como O y R, respectivamente, i) la intensidad de la luz sin filtro (totalmente óptica) F0 y ii) la intensidad de la luz que se transmite por el LP de 600 nm (filtro 1) F1 se describen como se indica a continuación:

$F0 = O + R$

$F1=\kappa O_{R60} \times O + \kappa R_{R60} \times R$

Estas fórmulas pueden expresarse también de la siguiente manera:

$$\begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix}$$

A continuación, utilizando los factores de transmitancia calculados ($\kappa O_{R60}$ y $\kappa R_{R60}$) y los valores medidos de F0 y F1, podrán calcularse los valores de O y R como sigue:

$$\begin{pmatrix} O \\ R \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 \\ \kappa O_{R60} & \kappa R_{R60} \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} F0 \\ F1 \end{pmatrix}$$

▼**M8**

**Materiales y métodos para determinar el factor de transmitancia**

1) *Reactivos*

Enzimas luciferasa aisladas y purificadas:

Enzima SLO purificada y liofilizada

Enzima SLR purificada y liofilizada

(que para el trabajo de validación se obtuvieron de GPC Lab. GPC Lab. Co. Ltd., Tottori, Japón, con la línea celular THP-G8).

Reactivo de ensayo:

Reactivo de ensayo de la luciferasa Tripluc® (por ejemplo, de TOYOBO Cat#MRA-301)

Medio: para el ensayo de la luciferasa (30 ml, conservado a 2-8ºC)

| Reactivo | Conc. | Conc. final en medio | Cantidad necesaria |
|---|---|---|---|
| RPMI-1640 | - | - | 27 ml |
| FBS | - | 10 % | 3 ml |

2) *Preparación de la solución de enzima:*

Disolver la enzima luciferasa purificada y liofilizada en un tubo mediante la adición de 200 µl de Tris/HCl o Hepes/HCl 10 ~ 100 mM (pH 7,5 ~ 8,0), complementados con glicerol al 10 % (p/v); dividir la solución de enzima en alícuotas de 10 µl puestas en tubos desechables de 1,5 ml y conservarlas en congelador a -80ºC; la solución de enzima congelada podrá utilizarse durante un máximo de 6 meses. Cuando se utiliza, se añade 1 ml de medio para el ensayo de la luciferasa (RPMI-1640 con un 10 % de FBS) a cada tubo que contiene las soluciones de enzima (solución diluida de enzima) y se mantiene en hielo para evitar la desactivación.

3) *Medición de la bioluminiscencia*

Descongelar el reactivo de ensayo de la luciferasa Tripluc® (Tripluc) y mantenerlo a temperatura ambiente en un baño de agua o al aire. Encender el luminómetro 30 min antes del inicio de la medición para permitir que se estabilice el fotomultiplicador. Pasar 100 µl de la solución diluida de enzima a una placa negra de 96 pocillos (fondo plano) (la muestra de referencia de SLO a #B1, #B2, #B3, la muestra de referencia de SLR a #D1, #D2, #D3). A continuación, pasar 100 µl de Tripluc precalentado a cada pocillo de la placa que contiene la solución diluida de enzima, utilizando una micropipeta. Agitar la placa durante 10 minutos a temperatura ambiente (alrededor de 25ºC) utilizando un agitador de placas. Eliminar las eventuales burbujas que aparezcan en las soluciones de los pocillos. Colocar la placa en el luminómetro para medir la actividad de la luciferasa. Se mide la bioluminiscencia durante 3 segundos tanto en ausencia (F0) como en presencia (F1) del filtro óptico.

Se calcula el coeficiente de transmisión del filtro óptico de la manera siguiente:

Coeficiente de transmisión [SLO ($\kappa O_{R60}$)] = (#B1 de F1 + #B2 de F1 + #B3 de F1) / (#B1 de F0 + #B2 de F0 + #B3 de F0)

▼**M8**

Coeficiente de transmisión [SLR ($\kappa R_{R60}$)] = (#D1 de F1 + #D2 de F1 + #D3 de F1) / (#D1 de F0 + #D2 de F0 + #D3 de F0)

Los factores de transmitancia calculados se utilizan para todas las mediciones realizadas con el mismo luminómetro.

**Control de calidad del equipo**

Se utilizarán los procedimientos descritos en el protocolo IL-8 (18).

▼**M8**

*Apéndice 3.3*

SUSTANCIAS UTILIZADAS PARA DEMOSTRAR LA COMPETENCIA

Antes de proceder al uso sistemático del ensayo descrito en el presente apéndice del método B.71, los laboratorios deben demostrar su competencia técnica mediante la obtención con el ensayo IL-8 Luc de la clasificación prevista de las nueve sustancias recomendadas en el cuadro 1, y la obtención de valores que estén dentro del intervalo de referencia respectivo con al menos ocho de las nueve sustancias utilizadas para demostrar la competencia (seleccionadas para representar la gama de respuestas correspondientes a los peligros de sensibilización cutánea). Otros criterios de selección fueron que las sustancias estén disponibles en el mercado y que se disponga de datos de referencia *in vivo* de alta calidad, así como de datos *in vitro* de alta calidad obtenidos con el ensayo IL-8 Luc. Asimismo, ha de disponerse de datos de referencia publicados sobre el ensayo IL-8 Luc (6) (1).

*Cuadro 1*

**Sustancias recomendadas para demostrar la competencia técnica con el ensayo IL-8 Luc**

| Sustancias para la competencia | Nº CAS | Estado físico | Solubilidad en X-VIVO15 a 20 mg/ml | Asignación *in vivo* (1) | Asignación con IL-8 Luc (2) | Intervalo de referencia (µg/ml) (3) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | $CV_{05}$ (4) | MIT con IL-8 Luc (5) |
| 2,4-Dinitroclorobenceno | 97-00-7 | Sólido | Insoluble | Sensibilizante (extremo) | Positivo | 2,3-3,9 | 0,5-2,3 |
| Formaldehído | 50-00-0 | Líquido | Soluble | Sensibilizante (fuerte) | Positivo | 9-30 | 4-9 |
| 2-Mercaptobenzotiazol | 149-30-4 | Sólido | Insoluble | Sensibilizante (moderado) | Positivo | 250-290 | 60-250 |
| Etilendiamina | 107-15-3 | Líquido | Soluble | Sensibilizante (moderado) | Positivo | 500-700 | 0,1-0,4 |
| Dimetacrilato de etilenglicol | 97-90-5 | Líquido | Insoluble | Sensibilizante (débil) | Positivo | > 2000 | 0,04-0,1 |
| 4-Alilanisol (estragol) | 140-67-0 | Líquido | Insoluble | Sensibilizante (débil) | Positivo | > 2000 | 0,01-0,07 |
| Sulfato de estreptomicina | 3810-74-0 | Sólido | Soluble | No sensibilizante | Negativo | > 2000 | > 2000 |
| Glicerol | 56-81-5 | Líquido | Soluble | No sensibilizante | Negativo | > 2000 | > 2000 |
| Isopropanol | 67-63-0 | Líquido | Soluble | No sensibilizante | Negativo | > 2000 | > 2000 |

Abreviaturas: Nº CAS = número de registro del Chemical Abstracts Service.
(1) La potencia *in vivo* se obtiene con los criterios propuestos por ECETOC (19).
(2) Sobre la base de los valores históricos observados (1) (6).
(3) Los valores de $CV_{05}$ y MIT con IL-8 Luc, Luc MIT se han calculado sobre la base de la hidrosolubilidad que da el EPI Suite™.
(4) $CV_{05}$: Concentración mínima a la que los productos muestran un valor de Inh-GAPLA inferior a 0,05.
(5) MIT: Concentración más baja a la que un producto cumple los criterios positivos.

▼M8

*Apéndice 3.4*

ÍNDICES Y CRITERIOS DE DECISIÓN

**nIL8LA (nSLO-LA)**

Se mide la repetición j (j = 1-4) de la concentración i (i = 0-1) en el caso de la IL8LA (SLO-LA) y la GAPLA (SLR-LA) respectivamente. La IL8LA normalizada, denominada nIL8LA (nSLO-LA), se define como:

$$nIL8LA_{ij} = IL8LA_{ij}/GAPLA_{ij}$$

Esta es la unidad básica de medición de este ensayo.

**Ind-IL8LA (FInSLO-LA)**

El número de veces que aumenta el promedio de nIL8LA (nSLO-LA) en la repetición a la concentración i con respecto a su valor a la concentración 0, Ind-IL8LA, es la medida primaria de este ensayo. Esta relación se expresa con la siguiente fórmula:

$$\mathrm{Ind-IL8LA_i} = \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{ij}}\right\} / \left\{(1/4) \times \sum_{j} \mathrm{nIL8LA_{0j}}\right\}$$

El laboratorio principal ha propuesto que un valor de 1,4 corresponde a un resultado positivo para el producto problema. Este valor se basa en la investigación de los datos históricos del laboratorio principal. El equipo de gestión de datos utilizó después este valor a través de todas las fases del estudio de validación. El resultado primario, Ind-IL8LA, es el cociente de dos medias aritméticas, tal como se indica en la ecuación.

**Intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %)**

Puede estimarse que el intervalo de confianza del 95 % (IC del 95 %) basado en el cociente muestra la precisión de la medida de este resultado primario. Un límite inferior del IC del 95 % ≥ 1 indica que la nIL8LA a la concentración i es significativamente mayor que la del control del disolvente. Hay varias formas de construir el IC del 95 %. Hemos utilizado en este estudio el método conocido como teorema de Fieller. Este teorema sobre el intervalo de intervalo de confianza del 95 % se obtiene de la siguiente fórmula:

$$\left[\frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}, \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A}\right],$$

donde: .

$$A = \bar{x}_0^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_0^2}{n_0}$$

$$B = -2 \times \bar{x} \times \bar{y}$$

$$C = \bar{y}_i^2 - t_{0.975(v)}^2 \times \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}, \text{ and } n_0 = 4$$

$$\bar{x}_0 = (1/n_0) \times \textstyle\sum_j \mathrm{nIL8LA_{0j}}$$

▼**M8**

$sd_0^2 = \{1/(n_0 - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{0j} - \overline{x}_0)^2$

$n_{yi} = 4$

$\overline{y}_i = (1/n_{yi}) \times \sum_j (nIL8LA_{ij})$

$sd_{yi}^2 = \{1/(n_{yj} - 1)\} \times \sum_j (nIL8LA_{ij} - \overline{y}_i)^2$

es el porcentil 97,5 de la distribución t central con la ν del grado de libertad, donde

$$\nu = \left(\frac{sd_0^2}{n_0} + \frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / \left\{ \left(\frac{sd_0^2}{n_0}\right)^2 / (n_0 - 1) + \left(\frac{sd_{yi}^2}{n_{yi}}\right) / (n_{yi} - 1) \right\}.$$

**Inh-GAPLA (II-SLR-LA)**

La Inh-GAPLA es una relación entre el promedio de la GAPLA (SLR-LA) correspondiente a la repetición de la concentración i en comparación con la del control del disolvente, y su valor viene dado por:

$$Inh - GAPLA_i = \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{ij} \right\} / \left\{ (1/4) \times \sum_j GAPLA_{0j} \right\}.$$

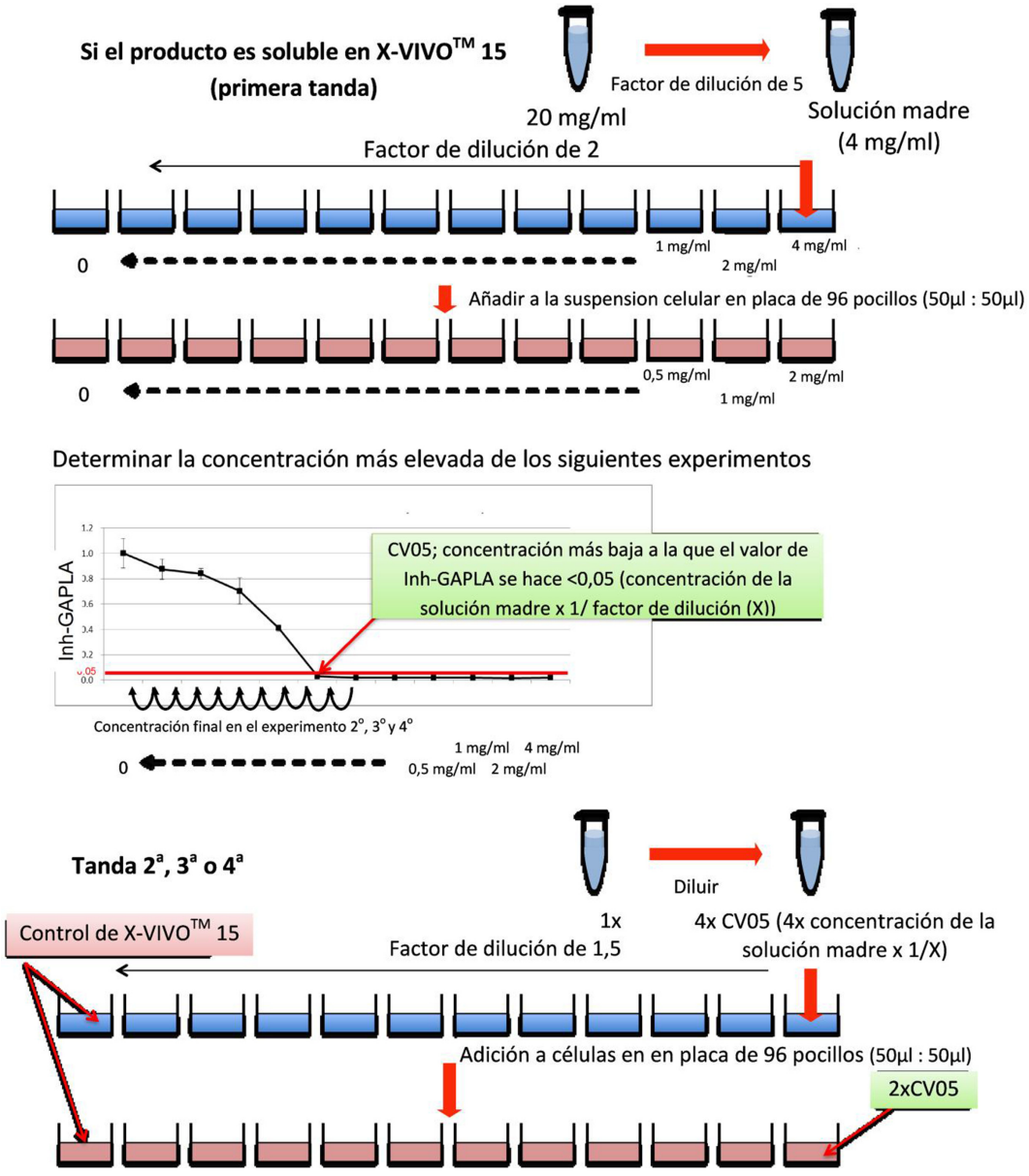
Como la GAPLA es el denominador de la nIL8LA, un valor sumamente pequeño causa una gran variación en el nIL8LA. Por tanto, los valores de Ind-IL8LA con un valor extremadamente bajo de Inh-GAPLA (menos de 0,05) pueden considerarse de escasa precisión.

▼**M8**

*Apéndice 3.5*

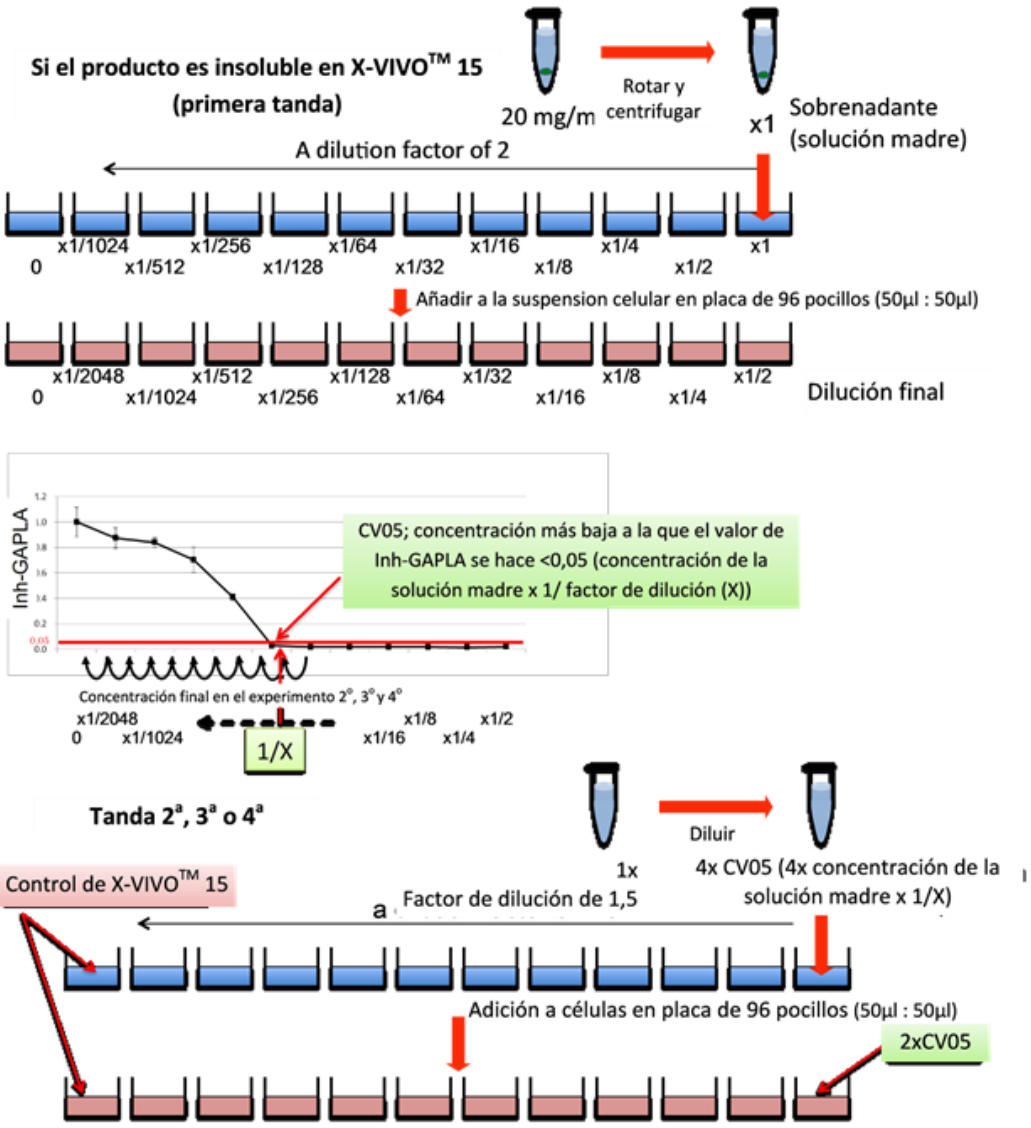
ESQUEMA DE LOS MÉTODOS DE DISOLUCIÓN DE LOS PRODUCTOS PARA EL ENSAYO IL-8 LUC

a) En el caso de los productos disueltos en X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



▼**M8**

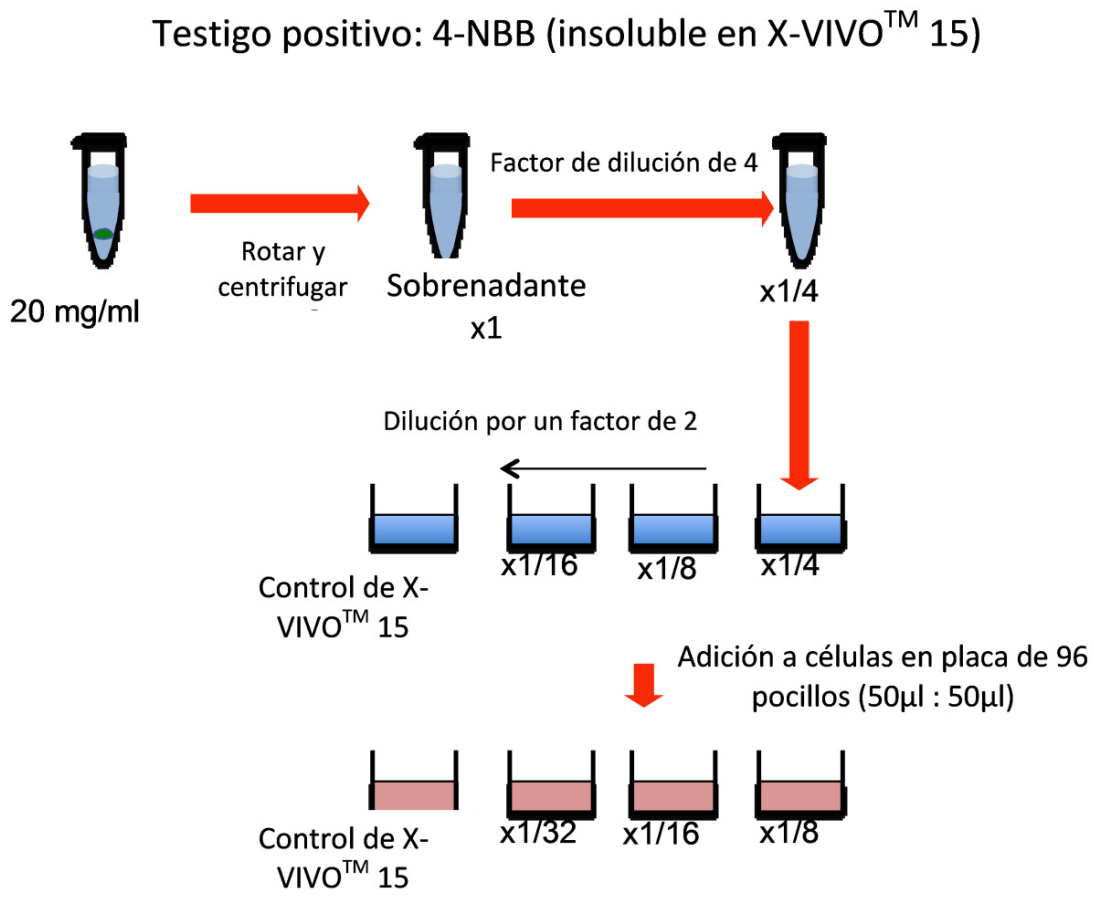
b) En el caso de los productos insolubles en X-VIVO™ 15 a 20 mg/ml



▼**M8**

*Apéndice 3.6*

ESQUEMA DEL MÉTODO DE DISOLUCIÓN DEL 4-NBB PARA EL TESTIGO POSITIVO DEL ENSAYO IL-8 LUC



▼B

**PARTE C: MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ECOTOXICIDAD**

ÍNDICE


C.1. TOXICIDAD AGUDA EN PECES

C.2. ENSAYO DE INMOVILIZACIÓN AGUDA DE *DAPHNIA* SP

C.3. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ALGAS Y CIANOBACTERIAS DE AGUA DULCE

C.4. DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD «FÁCIL»

PARTE I. CONSIDERACIONES GENERALES

PARTE II. ENSAYO BASADO EN LA PÉRDIDA DE COD (Método C.4-A)

PARTE III. ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA OCDE MODIFICADO (Método C.4-B)

PARTE IV. ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO DE $CO_2$ (Método C.4-C)

PARTE V. RESPIROMETRÍA MANOMÉTRICA (Método C.4-D)

PARTE VI. ENSAYO DEL FRASCO CERRADO (Método C.4-E)

PARTE VII. ENSAYO DEL M.I.T.I. (Método C.4-F)

C.5 DEGRADACIÓN: DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

C.6. DEGRADACIÓN: DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

C.7. DEGRADACIÓN — DEGRADACIÓN ABIÓTICA: HIDRÓLISIS EN FUNCIÓN DEL PH

C.8. TOXICIDAD PARA GUSANOS DE TIERRA

C.9. BIODEGRADACIÓN — PRUEBA ZAHN-WELLENS

C.10. PRUEBA DE SIMULACIÓN DE TRATAMIENTO AERÓBICO DE AGUAS RESIDUALES: C.10-A: UNIDADES DE LODO ACTIVADO — C.10-B: BIOPELÍCULAS

C.11. LODO ACTIVADO: PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN (OXIDACIÓN DE CARBONO Y DE AMONIO)

C.12. BIODEGRADACIÓN — PRUEBA LASC MODIFICADA

C.13. BIOACUMULACIÓN EN PECES: EXPOSICIÓN ACUÁTICA Y ALIMENTARIA

C.14. ENSAYO DE CRECIMIENTO EN PECES JUVENILES

C.15. ENSAYO DE TOXICIDAD A CORTO PLAZO EN *EMBRIONES* DE PEZ Y ALEVINES

C.16. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL AGUDA EN ABEJAS

C.17. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR CONTACTO EN ABEJAS

C.18. ADSORCIÓN/DESORCIÓN SEGÚN UN MÉTODO EQUILIBRADO POR LOTES

▼B

C.19. CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE ADSORCIÓN *($K_{OC}$)* EN SUELOS Y EN LODOS DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

C.20. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN *DAPHNIA MAGNA*

C.21. MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL NITRÓGENO

C.22. MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL CARBONO

C.23. TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN EL SUELO

C.24. TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN SISTEMAS DE SEDIMENTOS ACUÁTICOS

C.25. MINERALIZACIÓN AEROBIA EN AGUAS SUPERFICIALES. ENSAYO DE SIMULACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN

C.26. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *LEMNA* SPP.

C.27. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTO-AGUA CON SEDIMENTO ENRIQUECIDO

C.28. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTOS-AGUA CON AGUA ENRIQUECIDA

C.29. BIODEGRADABILIDAD FÁCIL—$CO_2$ EN RECIPIENTES SELLADOS (ENSAYO DEL ESPACIO DE CABEZA)

C.30. BIOACUMULACIÓN EN OLIGOQUETOS TERRESTRES

C.31. ENSAYO CON PLANTAS TERRESTRES: ENSAYO DE EMERGENCIA Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS

C.32. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN DE ENQUITREIDOS

C.33. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN DE LOMBRICES DE TIERRA (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*)

C.34. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BACTERIAS ANAEROBIAS. REDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS DE LODOS (DE DEPURADORA) EN CONDICIONES ANAERÓBICAS

C.35. PRUEBA DE TOXICIDAD PARA *LUMBRICULUS* EN SEDIMENTOS Y AGUA CON SEDIMENTO ENRIQUECIDO

C.36. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN DE UN ÁCARO PREDADOR [*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*] EN EL SUELO

C.37. ENSAYO DE VEINTIÚN DÍAS EN PECES: CRIBADO A CORTO PLAZO DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA Y ANDROGÉNICA Y DE LA INHIBICIÓN DE LA AROMATASA

C.38. ENSAYO SOBRE METAMORFOSIS DE ANFIBIOS

C.39. ENSAYO SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE COLÉMBOLOS EN EL SUELO

▼B

C.40. ENSAYO DE TOXICIDAD A LO LARGO DEL CICLO DE VIDA DE LOS QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTO-AGUA CON AGUA O SEDIMENTO ENRIQUECIDOS

C.41. ENSAYO DE DESARROLLO SEXUAL EN PECES

C.42. BIODEGRADABILIDAD EN AGUA DE MAR

C.43. BIODEGRADABILIDAD ANAERÓBICA DE LAS SUSTANCIAS ORGÁNICAS EN LODO DIGERIDO: POR MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GASES

C.44. LIXIVIACIÓN EN COLUMNAS DE SUELO

C.45. ESTIMACIÓN DE LAS EMISIONES AL MEDIO AMBIENTE DE MADERA TRATADA CON CONSERVANTES: MÉTODO DE LABORATORIO PARA PRODUCTOS DE MADERA NO RECUBIERTOS Y QUE ESTÁN EN CONTACTO CON AGUA DULCE O AGUA DE MAR

C.46. BIOACUMULACIÓN EN OLIGOQUETOS BENTÓNICOS QUE VIVEN EN LOS SEDIMENTOS

C.47. ENSAYO DE TOXICIDAD EN LAS PRIMERAS FASES DE VIDA DE LOS PECES

C.48. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN DE PECES A CORTO PLAZO

C.49. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA EN EMBRIONES DE PEZ (FET)

C.50. ENSAYO DE TOXICIDAD SIN SEDIMENTOS EN *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

C.51. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUA-SEDIMENTO EN *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

C.52. ENSAYO AMPLIADO DE REPRODUCCIÓN DE MEDAKA EN UNA GENERACIÓN (MEOGRT)

C.53. ENSAYO DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LARVAS DE ANFIBIOS (LAGDA)

▼B

## C.1. TOXICIDAD AGUDA EN PECES

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

El objeto de este ensayo es determinar la toxicidad letal aguda de una sustancia en peces de agua dulce. Es conveniente disponer, en la medida de lo posible, de una amplia información sobre la hidrosolubilidad, la presión de vapor, la estabilidad química, las constantes de disociación y la biodegradabilidad de la sustancia de ensayo, con el fin de seleccionar el método de ensayo más apropiado (estático, semiestático, dinámico), que permita garantizar concentraciones constantes de la sustancia de ensayo durante todo el período de ensayo.

Tanto en la planificación del ensayo como en la interpretación de los resultados deberá tenerse en cuenta otro tipo de información suplementaria (por ejemplo, la fórmula estructural, el grado de pureza, la naturaleza y porcentaje de impurezas significativas, la presencia y cantidad de aditivos, así como el coeficiente de reparto n-octanol/agua)

#### 1.2. DEFINICIÓN Y UNIDADES

La toxicidad aguda es el efecto adverso, discernible, inducido en un organismo como consecuencia de la exposición a una sustancia dada durante un corto período de tiempo (días). En el presente ensayo, la toxicidad aguda viene expresada como la concentración letal media ($CL_{50}$), es decir, la concentración que, en el agua, causa la muerte del 50 % de los peces de un lote sometido a ensayo durante un período de exposición continuo que debe indicarse.

Todas las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso por volumen (mg/l). Pueden expresarse también en peso por peso ($mg/kg^{-1}$).

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Se podrá efectuar un ensayo con una sustancia de referencia a fin de demostrar que, en las condiciones experimentales de laboratorio, la respuesta de la especie sometida al ensayo no ha variado significativamente.

Para este ensayo no se especifica ninguna sustancia de referencia.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Puede realizarse una prueba límite a 100 mg/l, para demostrar que la $CL_{50}$ es mayor que esta concentración.

Se exponen los peces a la sustancia o sustancias de ensayo añadidas al agua, durante un período de 96 horas y en un intervalo de concentraciones determinado. Se registra la mortalidad, como mínimo, cada 24 horas y se calculan, si es posible, las concentraciones causantes de la muerte del 50 % de los peces ($CL_{50}$) en cada período de observación.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Los criterios de calidad se aplicarán tanto al ensayo límite como al método de ensayo definitivo.

La mortalidad de los testigos, no debe sobrepasar el 10 % al final del ensayo (o un pez si se utilizan menos de 10).

La concentración de oxígeno disuelto debe ser superior al 60 % del valor de saturación, a la largo de todo el ensayo.

▼B

La concentración de la sustancia de ensayo debe ser superior al 80 % de la concentración inicial durante todo el ensayo.

Para las sustancias que se disuelven fácilmente en el medio de ensayo, produciendo soluciones estables, es decir, que no se volatilizan, degradan, hidrolizan ni adsorben en cantidad significativa, la concentración inicial puede considerarse equivalente a la concentración nominal. Se demostrará que se han mantenido las concentraciones a lo largo del ensayo y de que se han satisfecho los criterios de calidad.

En cuanto a las sustancias

i) poco solubles en el medio de ensayo, o

ii) capaces de formar emulsiones o dispersiones estables, o

iii) no estables en soluciones acuosas,

se tomará como concentración inicial la concentración medida en la solución (o, si no es técnicamente posible, medida en la columna de agua) al comienzo del ensayo. La concentración se determinará tras un período de equilibrio pero antes de introducir los peces de ensayo.

En cualquiera de estos casos se harán mediciones complementarias, durante el ensayo, con el fin de confirmar la concentración de exposición real o que se han mantenido los criterios de calidad.

El pH no variará más de 1 unidad.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Pueden utilizarse tres tipos de procedimientos.

*Ensayo estático*

Ensayo de toxicidad durante el cual no hay renovación de la solución de ensayo {las soluciones no se renuevan durante todo el ensayo).

*Ensayo semiestático*

Ensayo sin renovación continua de la solución de ensayo, pero con renovación periódica, de las soluciones de ensayo después de períodos prolongados (por ejemplo, cada 24 horas).

*Ensayo dinámico*

Ensayo de toxicidad durante el cual se va renovando constantemente el agua de los recipientes de ensayo. El producto químico sometido a ensayo se transporta con el agua utilizada para renovar el medio de ensayo.

1.6.1. **Reactivos**

1.6.1.1. *Soluciones de las sustancias de ensayo*

Las soluciones madre a las concentraciones requeridas se preparan disolviendo la sustancia en agua desionizada o en agua según el punto 1.6.1.2.

Las concentraciones elegidas para el ensayo se preparan mediante dilución de la solución madre. Si se procede a un ensayo a concentraciones elevadas, la sustancia puede disolverse directamente en el agua de dilución.

▼B

En general, las sustancias se ensayaran solo hasta su límite de solubilidad. En el caso de algunas sustancias (por ejemplo, aquellas que son poco hidrosolubles, que tienen un elevado $P_{ow}$ o que forman en el agua dispersiones estables más que verdaderas soluciones), se puede aceptar una concentración de ensayo por encima del límite de solubilidad de la sustancia a fin de garantizar que se obtiene la máxima concentración soluble/estable. Es importante, sin embargo, que esta concentración no altere por otra parte el sistema de ensayo (por ejemplo, formación en la superficie del agua de una película de la sustancia que impida la oxigenación del agua, etc.)

Puede utilizarse dispersión ultrasónica, solventes orgánicos, emulgentes o dispersantes para favorecer la preparación de las soluciones madre de las sustancias poco hidrosolubles o para que dichas sustancias se dispersen mejor en el medio de ensayo. Cuando se utilicen estas sustancias auxiliares, todas las concentraciones de ensayo deberán contener la misma cantidad de sustancia auxiliar y se expondrá un lote de peces como testigo suplementario a la misma concentración de la sustancia auxiliar que la utilizada en las series del ensayo. La concentración de esas sustancias auxiliares debe reducirse al mínimo, y en ningún caso será superior a 100 mg por litro en el medio de ensayo.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. Si se produjera un cambio significativo del pH, debe repetirse el ensayo ajustando el pH y registrar los resultados. En ese caso, el valor del pH de la solución madre debe ajustarse al valor del pH del agua de dilución, excepto que existan razones concretas que lo impidan. Para ajustar el pH se utilizará, preferentemente, HC1 o NaOH. Este ajuste del pH debe efectuarse de forma que no se modifique significativamente la concentración de la sustancia de ensayo en la solución madre. Si el ajuste ocasiona una reacción química o una precipitación física de la sustancia de ensayo, deberá mencionarse en el informe.

1.6.1.2. *Agua de mantenimiento y de dilución*

Se podrá utilizar agua potable (no contaminada por concentraciones potencialmente peligrosas de cloro, metales pesados u otras sustancias), agua natural de buena calidad o agua reconstituida (véase el Apéndice 1). Se preferirán las aguas cuya dureza total esté comprendida entre 10 y 250 mg por litro (como $CaCO_3$), y un pH comprendido entre 6,0 y 8,5.

1.6.2. **Equipo**

El equipo debe ser de material químicamente inerte:

— sistema de dilución automático (para el ensayo dinámico),

— aparato para medir el oxígeno,

— aparato para determinar la dureza del agua,

— equipo apropiado para el control de la temperatura,

— pHmetro.

1.6.3. **Peces del ensayo**

Los peces deben gozar de buena salud y estar exentos de malformaciones visibles.

▼B

Se recomienda que la especie utilizada se elija en función de criterios prácticos como disponibilidad inmediata durante todo el año, fácil mantenimiento, comodidad para el ensayo, sensibilidad relativa a las sustancias químicas, y todos los demás factores significativos económicos, biológicos o ecológicos. Debe tenerse también en cuenta, al seleccionar la especie de peces, la necesidad de que los datos sean comparables y la existencia de una armonización internacional en vigor (referencia 1).

Las especies que se recomiendan para la realización de este ensayo figuran en el apéndice 2; las especies preferidas son el pez cebra y la trucha.

1.6.3.1. *Mantenimiento*

Los peces que se someten al ensayo deberán provenir preferentemente de un solo lote, siendo todos los individuos de longitud y edad similares. Deben mantenerse, al menos durante 12 días, en las siguientes condiciones.

*Carga:*

apropiada al sistema (recirculación o ensayo dinámico) y a la especie de peces.

*Agua:*

véase el punto 1.6.1.2.

*Luz:*

fotoperíodo de 12 a 16 horas por día.

*Concentración de oxigeno disuelto:*

al menos 80 % del valor de saturación.

*Alimentación:*

diariamente o 3 veces por semana; la alimentación debe ser interrumpida 24 horas antes de comenzar el ensayo.

1.6.3.2. *Mortalidad*

Se registrará la mortalidad después de un período inicial de 48 horas. Se juzgará la calidad del lote según los siguientes criterios:

— mortalidad superior al 10 % de la población en 7 días:

se rechaza todo el lote,

— mortalidad al cabo de 7 días comprendida entre el 5 y el 10 % de la población:

se prolongará el período de observación 7 días más.

Si no aparecen nuevas mortalidades, se admite el lote, en caso contrario debe rechazarse,

— mortalidad inferior al 5 % de la población:

se admite el lote.

1.6.4. **Adaptación**

Los peces deben mantenerse en las condiciones de ensayo (calidad y temperatura del agua), durante al menos 7 días antes de su utilización.

▼B

1.6.5. **Procedimiento del ensayo**

Antes del ensayo definitivo se puede proceder a un ensayo para determinar el intervalo de concentraciones eficaces, el cual proporcionará información sobre el intervalo de concentraciones que deberán utilizarse en el ensayo definitivo.

Se efectuará un control (o testigo), sin sustancia de ensayo y, si se considera importante, un control (o testigo) con la sustancia auxiliar, además de las concentraciones de ensayo propiamente dichas.

Se elegirá un método estático, semiestático o dinámico, en función de las propiedades físicas y químicas de la sustancia de ensayo, para cumplir los criterios de calidad.

Los peces estarán expuestos a la sustancia de ensayo en las siguientes condiciones:

— duración: 96 horas,

— número de animales: al menos 7 por concentración,

— recipientes: de una capacidad apropiada, en función de la carga recomendada,

— carga: se recomienda una carga máxima de 1,0 g por litro para los ensayos estáticos y semiestáticos; para los ensayos dinámicos se puede aceptar una carga más elevada,

— concentraciones de ensayo: al menos cinco concentraciones de ensayo que difieran en un factor constante no mayor de 2,2 y abarcando si es posible el intervalo de 0 a 100 % de mortalidad,

— agua: véase el punto 1.6.1.2,

— luz: fotoperíodo de 12 a 16 horas por día,

— temperatura: apropiada para la especie elegida (apéndice 2), pero en los límites de ± 1 $^{o}$C, en cualquier ensayo concreto,

— concentración en oxígeno disuelto: al menos el 60 % del valor de la saturación a la temperatura elegida,

— alimento: ninguno.

Los peces se observaran después de las 2 a 4 primeras horas y, al menos, a intervalos de 24 horas. Los peces son considerados muertos si el toque del pedúnculo caudal no produce reacción alguna y no se percibe ningún movimiento respiratorio. Los peces muertos se retirarán en el momento de cada observación y se registrará la mortalidad. Se registrarán las anomalías visibles (por ejemplo, pérdida de equilibrio, cambios en el comportamiento natatorio, función respiratoria, pigmentación, etc.).

Diariamente se medirá el pH, el oxígeno disuelto y la temperatura.

*Ensayo límite*

Puede realizarse un ensayo límite a 100 mg por litro, utilizando los procedimientos descritos en este método de ensayo, con el fin de demostrar que la $CL_{50}$ es mayor que dicha concentración.

Si la naturaleza de la sustancia no permite alcanzar una concentración de 100 mg por litro en el agua de ensayo, el ensayo límite debe ser realizado a una concentración igual a la solubilidad de la sustancia (o a la máxima concentración que forme una dispersión estable) en el medio utilizado (véase también el punto 1.6.1.1).

▼B

El ensayo límite se realizará utilizando de 7 a 10 peces, y el mismo número en los controles (o testigos). (La teoría binomial indica que cuando se utilizan 10 peces y la mortalidad es cero, hay un limite de confianza del 99,9 % de que la $CL_{50}$ es mayor que la concentración usada en el ensayo límite. Si se utilizan 7, 8 o 9 peces, la ausencia de mortalidad proporciona un límite de confianza del 99 % de que la $CL_{50}$ es mayor que la concentración usada.)

Si aparece mortalidad, debe ser realizado un estudio completo. Si se observan efectos subletales, deben registrarse.

2. **RESULTADOS Y EVALUACIÓN**

Se trazará sobre papel log-probit el porcentaje de mortalidad en función de la concentración, para cada período en que se registren observaciones (24, 48, 72 y 96 horas).

Cuando sea posible y para cada tiempo de observación, se calculará la $CL_{50}$ con sus límites de confianza ($p = 0,05$) utilizando procedimientos estandarizados; estos valores se redondearán a una o, como mucho, dos cifras significativas (ejemplos de redondeo a dos cifras: 170 en lugar de 173,5; 0,13 en lugar de 0,127; 1,2 en lugar de 1,21).

Si la pendiente de la curva de concentración/porcentaje de respuesta es demasiado acentuada como para permitir calcular la $CL_{50}$, bastará con una estimación gráfica de este valor.

Si dos concentraciones consecutivas, con una razón de 2,2, dan solo 0 y 100 % de mortalidad, estos dos valores serán suficientes para indicar el rango en el que se encuentra la $CL_{50}$.

Si se observa que la estabilidad o la homogeneidad de la sustancia de ensayo no puede mantenerse, se mencionará en el informe y se tendrá en cuenta al interpretar los resultados.

3. **INFORME**

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

— información acerca del pez de ensayo (nombre científico, cepa, proveedor, tratamiento previo eventual, tamaño y número utilizado en cada concentración de ensayo),

— origen del agua de dilución y sus principales características químicas (pH, dureza, temperatura),

— en el caso de una sustancia poco hidrosoluble, método de preparación de la solución madre y de las soluciones de ensayo,

— concentraciones de las eventuales sustancias auxiliares,

— relación de las concentraciones utilizadas y cualquier información disponible sobre la estabilidad, a dichas concentraciones, de la sustancia en la solución de ensayo,

— si se realizan análisis químicos, los métodos utilizados y los resultados obtenidos,

— resultados del ensayo límite, si se ha realizado,

— motivos de la elección y los detalles del procedimiento de ensayo utilizado (por ejemplo, sistema estático, semiestático, dinámico, velocidad de administración, tasa de renovación, aireación o no, carga de peces, etc.),

▼B

— descripción del equipo de ensayo,

— régimen de iluminación,

— concentraciones del oxígeno disuelto, valores de pH y temperaturas de las soluciones de ensayo cada 24 horas,

— pruebas de que se han respetado los criterios de calidad,

— tabla que muestre la mortalidad acumulada para cada concentración y para el testigo (y, en su caso, el testigo con producto auxiliar) para cada uno de los tiempos de observación recomendados,

— representación gráfica de los porcentajes de mortalidad en función de las concentraciones al final del ensayo,

— si es posible, valores de la $CL_{50}$ en cada uno de los tiempos de observación recomendados (límite de confianza del 95 %),

— métodos estadísticos utilizados para determinar los valores de la $CL_{50}$,

— si se utiliza una sustancia de referencia, resultados obtenidos,

— concentración máxima utilizada que no haya causado mortalidad durante el período de ensayo,

— concentración mínima utilizada que haya causado un 100 % de mortalidad durante el período de ensayo.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE, París 1981, Test Guideline 203, Decisión del Consejo C(81) 30 final, y actualizaciones.

(2) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Bracbydanio rerio* — Static and Flow Through methods — NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR — Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* — Static and Flow Through methods — NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 — Water Quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish *(Bracbydanio rerio* Hamilton-Buchanan — Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Suiza, Richtlinien für Probenahme und Normung von Wasserun- tersuchungsmethoden — Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) und L (15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 — Water — Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van Poecilia *reticulata,* 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, *Office of Research and Development*, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, 14th edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.

(13) Comisión de las Comunidades Europeas, Inter-Laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Ökotoxikologie, Grundlagen für die Ökotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D.J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K, 1978.

(17) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. I Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol.3, 793–821.

(18) Sprague, J.B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Il Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3-32.

(19) Stephan, C.E. Methods for calculating an $LC_{50}$. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink), American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65-84.

(20) Stephan, C.E., Busch, K.A., Smith, R., Burke, J. y Andrews, R.W. A computer program for calculating an $LC_{50}$. US EPA.

▼B

*Apéndice 1*

**Agua reconstituida**

*Ejemplo de agua de dilución adecuada*

Los productos químicos deben ser de calidad analítica.

El agua debe ser agua destilada de buena calidad, o agua desionizada de una conductividad inferior a 5 $\mu Scm^{-1}$.

El aparato para la destilación del agua no contendrá ningún componente de cobre.

*Soluciones madre*

$CaCl_2$. $2H_2O$ (cloruro de calcio dihidratado): 11,76 g

disolver y enrasar a un litro con agua.

$MgSO_4$. $7H_2O$ (sulfato de magnesio heptahidratado): 4,93 g

disolver y enrasar a un litro con agua.

$NaHCO_3$ (carbonato ácido de sodio): 2,59 g

disolver y enrasar a un litro con agua.

KCl (cloruro de potasio): 0,23 g

disolver y enrasar a un litro con agua.

*Agua de dilución reconstituida*

Mezclar 25 ml de cada una de las cuatro soluciones madre y completar hasta un litro con agua.

Airear hasta que la concentración de oxígeno disuelto sea igual al valor de saturación del aire.

El pH debe ser 7,8 ± 0,2.

Si es necesario, ajustado con NaOH (hidróxido de sodio) o HCl (ácido clorhídrico).

El agua de dilución así preparada se deja reposar durante unas 12 horas y no debe ser aireada posteriormente.

La suma de iones Ca/Mg en esta solución es igual a 2,5 mmol/l. La relación de los iones Ca:Mg es de 4:1, la de los iones Na:K de 10:1. La alcalinidad total de esta solución es igual a 0,8 mmol/1.

Cualquier desviación en la preparación del agua de dilución no debe modificar su composición ni sus propiedades.

▼B

*Apéndice 2*

**Especies de peces recomendadas para el ensayo**

| Especies recomendadas | Intervalo recomendado de temperaturas de ensayo (°C) | Longitud total recomandada del pez de ensayo (cm) |
|---|---|---|
| *Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae)* (Hamilton-Buchanan) Pez cebra | 20 a 24 | 3,0 ± 0,5 |
| *Pimephales prometas (Teleostei, Cyprinidae)* (Rafinesque) Pez cabeza gorda | 20 a 24 | 5,0 ± 2,0 |
| *Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae)* (Linnaeus 1758) Carpa común | 20 a 24 | 6,0 ± 2,0 |
| *Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliiae) Cyprinodontidae* (Tomminck y Schlegel 1850) Medaka | 20 a 24 | 3,0 ± 1,0 |
| *Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae)* (Peters 1859) Guppy | 20 a 24 | 3,0 ± 1,0 |
| *Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae)* (Rafinesque Linnaeus 1758) Agallas azules | 20 a 24 | 5,0 ± 2,0 |
| *Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae)* (Walbaum 1988) Trucha arco iris | 12 a 17 | 6,0 ± 2,0 |
| *Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae)* (Linnaeus 1758) Caho | 20 a 24 | 6,0 ± 2,0 |

**Aprovisionamiento**

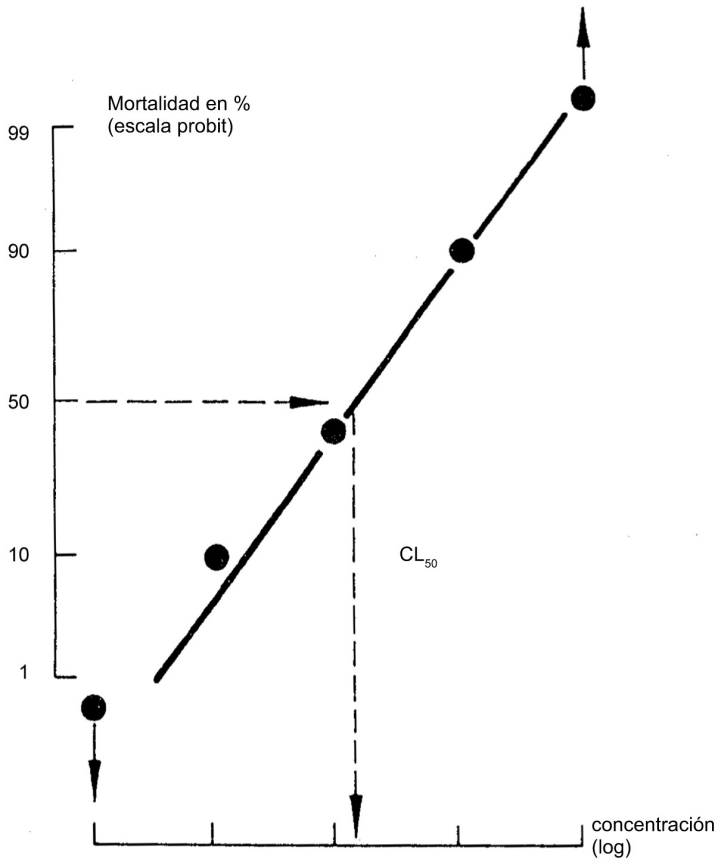
Los peces que se mencionan arriba son fáciles de criar y se puede disponer fácilmente de ellos durante todo el año. Pueden reproducirse y desarrollarse en explotaciones piscícolas o en el laboratorio, en condiciones sanitarias controladas, de forma que el animal que se someta al ensayo esté sano y su origen sea conocido. Estos peces están disponibles en casi todo el mundo.

▼B

*Apéndice 3*

**Ejemplo de curva de procentaje de mortalidad/concentración**

Ejemplo de determinación de la $CL_{50}$ en un papel log-probit



▼B

## C.2. ENSAYO DE INMOVILIZACIÓN AGUDA DE *DAPHNIA* SP.

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo de inmovilización aguda es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 202 (2004).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El presente método describe un ensayo de toxicidad aguda para evaluar los efectos de las sustancias químicas en los dáfnidos. En la medida de lo posible se han utilizado los métodos de ensayo existentes (1) (2) (3).

### 1.2. DEFINICIONES

A efectos del presente método, se entenderá por:

«**$CE_{50}$**»: la concentración estimada que inmoviliza al 50 % de los dáfnidos en un plazo de exposición definido; si se utiliza otra definición, deberá indicarse junto con su referencia,

«**inmovilización**»: la situación de los animales incapaces de nadar en el plazo de 15 segundos tras una agitación suave del recipiente de ensayo (aunque puedan seguir moviendo las antenas).

### 1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se exponen dáfnidos jóvenes, de menos de 24 horas de edad al inicio del ensayo, a una gama de concentraciones de la sustancia problema durante 48 horas. Se registra la inmovilización a las 24 y a las 48 horas, y se compara con los valores de los controles. Se analizan los resultados para calcular la $CE_{50}$ a las 48 horas (véanse las definiciones del punto 1.2). La determinación de la $CE_{50}$ a las 24 horas es optativa.

### 1.4. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Hay que conocer la solubilidad en agua y la presión de vapor de la sustancia problema; también se debe disponer de un método analítico fiable para cuantificar la sustancia en las soluciones problema con la eficiencia de recuperación y el límite de determinación establecidos. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural de la sustancia problema, su pureza, estabilidad en el agua y a la luz, $P_{ow}$, y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

Nota: En la referencia (4) se ofrece orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan estos ensayos.

### 1.5. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Puede estudiarse la $CE_{50}$ de una sustancia de referencia como forma de garantizar la fiabilidad de las condiciones del ensayo. Con este fin se recomienda utilizar sustancias tóxicas empleadas en ensayos interlaboratorios internacionales (1)(5) ([1]). La frecuencia de los ensayos con una sustancia de referencia debe ser preferentemente mensual, y al menos semestral.

([1]) Los resultados de estos ensayos interlaboratorios y unas correcciones técnicas de la norma ISO 6341 indican una $CE_{50}$-24 h de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) en la banda de 0,6 mg/l a 1,7 mg/l.

▼B

1.6. CRITERIOS DE CALIDAD

Para que un ensayo sea válido, los resultados deben cumplir los siguientes criterios:

— en los controles, incluido el que contiene el agente solubilizante, no debe quedar inmovilizado más del 10 % de los dáfnidos,

— la concentración de oxígeno disuelto al final del ensayo debe ser ≥ 3 mg/l en los recipientes de control y de ensayo.

Nota: Respecto al primer criterio, no más del 10 % de los dáfnidos de control pueden presentar inmovilización u otros signos de enfermedad o presión, por ejemplo, decoloración o comportamiento anómalo, como quedar retenidos en la superficie del agua.

1.7. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.7.1. **Equipo**

Los recipientes de ensayo y demás equipo que hayan de entrar en contacto con las soluciones problema serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte. Los recipientes de ensayo consistirán normalmente en tubos de ensayo o vasos de precipitados; deben lavarse antes de cada utilización siguiendo procedimientos normalizados de laboratorio. Los recipientes de ensayo deben cubrirse de forma no hermética para reducir la pérdida de agua debida a la evaporación y para evitar la entrada de polvo en las soluciones. Los ensayos con sustancias volátiles deben realizarse en recipientes cerrados y completamente llenos, de volumen suficiente para evitar que el oxígeno llegue a un nivel limitante o demasiado bajo (véanse el punto 1.6 y el párrafo primero del punto 1.8.3).

Además se utilizarán algunos de los instrumentos siguientes o todos ellos: oxigenómetro (con microelectrodo u otro equipo que sea conveniente para medir el oxígeno disuelto en muestras de pequeño volumen), pH-metro, instrumento adecuado para controlar la temperatura, equipo para determinar la concentración de carbono orgánico total (COT), equipo para determinar la demanda química de oxígeno (DQO), aparato para determinar la dureza, etc.

1.7.2. **Organismo de ensayo**

La especie recomendada es *Daphnia magna* Straus, aunque pueden utilizarse en este ensayo otras especies adecuadas de *Daphnia* (por ejemplo, *Daphnia pulex)*. Los animales tendrán una edad inferior a 24 horas al principio del ensayo y, para reducir la variabilidad, se recomienda fervientemente que no sean progenie de primera nidada. Han de proceder de una población sana (es decir, sin signos de presión, tales como mortalidad elevada, presencia de machos y efipios, retraso de la producción de la primera nidada, animales decolorados, etc.). Todos los organismos utilizados para un ensayo concreto deben proceder de cultivos establecidos a partir de la misma población de dáfnidos. Los animales del cultivo madre deben mantenerse en condiciones (luz, temperatura, medio) similares a las que se vayan a usar en el ensayo. Si el medio de cultivo de dáfnidos que se va utilizar en el ensayo es diferente del utilizado en cultivos normales de dáfnidos, es adecuado incluir una fase de aclimatación previa al ensayo. Con este objetivo, los dáfnidos de la nidada deben mantenerse en agua de dilución a la temperatura del ensayo durante al menos 48 horas antes del inicio del ensayo.

▼B

1.7.3. **Agua de mantenimiento y de dilución**

Puede utilizarse como agua de mantenimiento y de dilución el agua natural (superficial o subterránea), el agua reconstituida o el agua del grifo desclorada, siempre que los dáfnidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo, aclimatación y ensayo sin mostrar signos de presión. Es adecuada como agua de ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en el anexo 1. La calidad del agua ha de ser constante a lo largo de todo el ensayo. El agua reconstituida puede obtenerse añadiendo al agua desionizada o destilada cantidades específicas de reactivos de pureza analítica reconocida. En el anexo 2 y en las referencias (1) y (6) se dan ejemplos de agua reconstituida. Obsérvese que, para el ensayo de sustancias con metales, ha de evitarse utilizar medios que contengan agentes quelantes conocidos, como los medios M4 y M7 del anexo 2. El pH debe encontrarse en la banda de 6 a 9. La dureza recomendada es de entre 140 y 250 mg/l (en $CaCO_3$) para *Daphnia magna,* pero con otras especies de *Daphnia* también puede ser adecuada una dureza menor. El agua de dilución tiene que airearse antes de su utilización en el ensayo, de forma que la concentración de oxígeno disuelto llegue a la saturación.

Si se utiliza agua natural, deben medirse los parámetros de calidad al menos dos veces al año o siempre que se sospeche la posibilidad de algún cambio significativo en estas características (véanse el párrafo anterior y el anexo 1). Debe medirse también la concentración de metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Si se utiliza agua del grifo desclorada, es recomendable hacer cada día un análisis del cloro. Si el agua de dilución es de una fuente de agua superficial o subterránea, deben medirse la conductividad y el carbono orgánico total (COT) o la demanda química de oxígeno (DQO).

1.7.4. **Soluciones problema**

Las soluciones problema con las concentraciones elegidas se preparan normalmente por dilución de una solución madre. Preferentemente, estas soluciones madre deben prepararse disolviendo la sustancia problema en agua de dilución. Debe evitarse, en la medida de lo posible, el uso de disolventes, emulgentes o dispersantes. Sin embargo, estos compuestos pueden ser necesarios en algunos casos para obtener una solución madre a la concentración deseada. En la referencia (4) se dan orientaciones sobre disolventes, emulgentes y dispersantes adecuados. En cualquier caso, la cantidad de sustancia problema contenida en las soluciones problema no debe sobrepasar el límite de solubilidad en el agua de dilución.

El ensayo debe realizarse sin ajustar el pH. Si el pH no queda en la banda de 6 a 9, puede realizarse un segundo ensayo en el que se ajuste el pH de la solución madre al del agua de dilución antes de la adición de la sustancia problema. El ajuste del pH debe hacerse de forma que la concentración de la solución madre no cambie de forma significativa y no se produzca ninguna reacción química ni precipitación de la sustancia problema. Las sustancias recomendadas son HCl y NaOH.

▼B

1.8. PROCEDIMIENTO

1.8.1. **Condiciones de exposición**

1.8.1.1. *Grupos de ensayo y controles*

Los recipientes de ensayo se llenan con volúmenes adecuados de agua de dilución y de soluciones de la sustancia problema. La proporción de volumen de aire y de agua en el recipiente debe ser la misma en los grupos de ensayo y de control. A continuación se ponen los dáfnidos en los recipientes de ensayo. Con cada concentración de ensayo y cada control deben utilizarse al menos 20 animales, de preferencia divididos en cuatro grupos de cinco animales cada uno. Para cada animal deben preverse al menos 2 ml de solución problema (es decir, un volumen de 10 ml para cinco dáfnidos en cada recipiente de ensayo). La prueba puede realizarse con un sistema de renovación semiestática o dinámica si no es estable la concentración de la sustancia problema.

Además de la serie de tratamiento, debe utilizarse una serie de control con el agua de dilución y, si procede, otra serie de control con el agente solubilizante.

1.8.1.2. *Concentraciones de ensayo*

Puede efectuarse un experimento previo para determinar la gama de concentraciones que se han de utilizar en el ensayo definitivo, salvo que se disponga de información sobre la toxicidad de la sustancia problema. A tal fin, los dáfnidos se exponen a una serie de concentraciones de la sustancia problema muy diferentes entre sí. Deben exponerse cinco dáfnidos a cada concentración de ensayo durante un máximo de 48 horas, y no es necesario efectuar ninguna prueba en paralelo. Es posible abreviar el plazo de exposición (por ejemplo, a 24 horas o menos) si pueden obtenerse en menos tiempo datos adecuados para los fines del experimento de determinación de la gama de concentraciones.

Se emplearán al menos cinco concentraciones de ensayo, que formarán una progresión geométrica con una razón preferentemente no superior a 2,2. Si se usan menos de cinco concentraciones, hay que justificarlo. La mayor concentración estudiada debe provocar de preferencia una inmovilización del 100 %, y la menor concentración estudiada no debe provocar de preferencia ningún efecto observable.

1.8.1.3. *Condiciones de incubación*

La temperatura debe estar entre 18 $^{o}$C y 22 $^{o}$C, y en cada uno de los ensayos debe mantenerse constante, con una variación máxima de ± 1 $^{o}$C. Se recomienda un ciclo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. También puede aceptarse la oscuridad completa, especialmente si la sustancia problema es inestable a la luz.

Los recipientes de ensayo no deben airearse durante el ensayo. El ensayo se realiza sin ajustar el pH. No se debe proporcionar alimento a los dáfnidos durante el ensayo.

1.8.1.4. *Duración*

La duración del ensayo es de 48 horas.

1.8.2. **Observaciones**

Debe comprobarse si hay dáfnidos inmovilizados en cada recipiente de ensayo a las 24 y 48 horas desde el inicio del ensayo (véanse las definiciones del punto 1.2). Además de la inmovilidad, debe indicarse todo eventual aspecto o comportamiento anormal.

▼B

1.8.3. **Mediciones analíticas**

El oxígeno disuelto y el pH se miden al inicio y al final del ensayo en los recipientes de los controles y en los de la mayor concentración de sustancia problema. La concentración de oxígeno disuelto de los controles debe cumplir el criterio de validez (véase el punto 1.6). El pH no debe variar en principio más de 1,5 unidades en ninguno de los ensayos. La temperatura se suele medir en los recipientes de control o en el aire ambiente y debe registrarse preferentemente de forma continua durante el ensayo o, como mínimo, al inicio y al final del mismo.

La concentración de la sustancia problema debe medirse, como mínimo, en los recipientes con la concentración más elevada y más baja, al principio y al final del ensayo (4). Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. No obstante, si los datos disponibles muestran que la concentración de la sustancia problema se ha mantenido debidamente a lo largo de todo el ensayo en un intervalo de ± 20 % de la concentración inicial nominal o medida, los resultados pueden fundarse en estos valores iniciales nominales o medidos.

1.9. ENSAYO LÍMITE

Siguiendo los procedimientos descritos en el presente método, puede efectuarse un ensayo límite con 100 mg/l de sustancia problema o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo, si este es inferior, a fin de demostrar que la $CE_{50}$ es mayor que esta concentración. El ensayo límite debe hacerse utilizando 20 dáfnidos (preferentemente divididos en cuatro grupos de cinco), con igual número en el control o controles. Si se observa alguna inmovilización, debe realizarse un estudio completo. Deben registrarse los eventuales comportamientos anormales observados.

2. **DATOS**

Los datos deben resumirse en forma de cuadro, indicando respecto a cada grupo de tratamiento y de control el número de dáfnidos utilizados y la inmovilización en cada observación. Deben representarse gráficamente los porcentajes de inmovilización a las 24 y 48 horas frente a las concentraciones de sustancia problema. Los datos se analizan mediante métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, análisis de probit, etc.) para calcular las pendientes de las curvas y la $CE_{50}$ con unos límites de confianza del 95 % ($p = 0,05$) (7) (8).

Cuando los métodos normales de cálculo de la $CE_{50}$ no sean aplicables a los datos obtenidos, se utilizarán la concentración más elevada que no provoque inmovilidad y la concentración más baja que provoque un 100 % de inmovilidad para estimar la $CE_{50}$, considerada como la media geométrica de estas dos concentraciones.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia problema:

— naturaleza fisica y propiedades fisicoquímicas pertinentes,

▼B

— identificación química, incluida la pureza.

Especie de ensayo:

— procedencia y especie de *Daphnia,* proveedor original (si se conoce) y condiciones de cultivo utilizadas (con inclusión de la procedencia, el tipo y la cantidad del pienso, así como la frecuencia de la alimentación).

Condiciones de ensayo:

— descripción de los recipientes de ensayo: tipo de recipientes, volumen de solución, número de dáfnidos por recipiente de ensayo, número de recipientes de ensayo (en paralelo) por concentración,

— métodos de preparación de las soluciones madre y problema, incluido el eventual uso de dispersantes; concentraciones utilizadas,

— origen del agua de dilución y características cualitativas del agua (pH, dureza, proporción Ca/Mg, proporción Na/K, alcalinidad, conductividad, etc.); composición del agua reconstituida si se utiliza,

— condiciones de incubación: temperatura, intensidad y periodicidad de la luz, oxígeno disuelto, pH, etc.

Resultados:

— número y porcentaje de dáfnidos inmovilizados o que presentan cualquier efecto nocivo (incluido un comportamiento anormal) en los controles y en cada grupo de tratamiento, en cada momento de observación, y descripción de la naturaleza de los efectos observados,

— resultados y fecha del ensayo efectuado con la sustancia de referencia, si se conocen,

— concentraciones nominales de ensayo y resultados de todos los análisis para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo; también deben indicarse la eficiencia de recuperación del método y el límite de determinación,

— todas las mediciones fisicoquímicas de temperatura, pH y oxígeno disuelto efectuadas durante el ensayo,

— la $CE_{50}$ de inmovilización a las 48 horas, con intervalos de confianza y gráficos del modelo ajustado utilizado para su cálculo, las pendientes de las curvas dosis-respuesta y su error típico, métodos estadísticos utilizados para la determinación de la $CE_{50}$ (también deben indicarse estos datos en relación con la inmovilización a las 24 horas si se han obtenido),

— explicación de las eventuales desviaciones respecto al método de ensayo y de la medida en que afecten a los resultados de ensayo.

4. **REFERENCIAS**

1. ISO 6341. (1996). Water quality — Determination of the inhibition of the mobility *of Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — Acute toxicity test. Third edition, 1996.

2. EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines — Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

3. Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

4. Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

5. Comisión de las Comunidades Europeas. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

7. Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an $LC_{50}$. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. Hamelink). ASTM STP 634 — American Society for Testing and Materials. p. 65-84

8. Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

*Anexo 1*

**ALGUNAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE**

| Sustancia | Concentración |
|---|---|
| Partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoniaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

▼B

*Anexo 2*

## EJEMPLOS DE AGUA RECONSTITUIDA ACEPTABLE PARA EL ENSAYO

**Agua de ensayo iso (1)**

| Soluciones madre (una sola sustancia) | | Para preparar el agua reconstituida, añádanse los volúmenes siguientes de soluciones madre a 1 litro de agua (*) |
|---|---|---|
| Sustancia | Cantidad añadida a 1 litro de agua (*) | |
| Cloruro de calcio $CaCl_2 . 2H_2O$ | 11,76 g | 25 ml |
| Sulfato de magnesio $MgSO_4 . 7H_2O$ | 4,93 g | 25 ml |
| Bicarbonato de sodio $NaHCO_3$ | 2,59 g | 25 ml |
| Cloruro de potasio KCl | 0,23 g | 25 ml |

(*) Agua de pureza adecuada como, por ejemplo, agua desionizada, destilada o tratada mediante ósmosis inversa con una conductividad que de preferencia no exceda de 10 $\mu S.cm^{-1}$.

**Medios M7 y M4 de Elendt**

**Aclimatación a los medios M4 y M7 de Elendt**

Algunos laboratorios han tenido dificultades para transferir directamente las dafnias a los medios M4 y M7. Sin embargo, se han obtenido resultados bastante buenos con una aclimatación gradual, esto es, cambiando del medio propio a Elendt al 30 %, luego al 60 % y por último al 100 %. El período de aclimatación necesario puede ser bastante largo, incluso de un mes.

**Preparación**

*Oligoelementos*

Se empieza por preparar soluciones madre distintas (I) de cada oligoelemento en agua de pureza apropiada (desionizada, destilada o tratada mediante ósmosis inversa). A partir de estas soluciones madre (I) se prepara una segunda solución madre única (II) que contiene todos los oligoelementos (solución combinada), de la forma siguiente:

| Soluciones madre I (una sola sustancia) | Cantidad añadida al agua (mg/l) | Concentración (en relación con el medio M4) | Para preparar la solución madre II combinada, se añade al agua la siguiente cantidad de solución madre I (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ | 57 190 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $MnCl_2.4H_2O$ | 7 210 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6 120 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |

▼B

| Soluciones madre I (una sola sustancia) | Cantidad añadida al agua (mg/l) | Concentración (en relación con el medio M4) | Para preparar la solución madre II combinada, se añade al agua la siguiente cantidad de solución madre I (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| RbCl | 1 420 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $SrCl_2.6H_2O$ | 3 040 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $Na_2\ MoO_4.2H_2O$ | 1 230 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $CuCl_2.2H_2O$ | 335 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 200 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| KI | 65 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2\ SeO_3$ | 43,8 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| NH4VO3 | 11,5 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2$ EDTA.$2H_2O$ | 5 000 | 2 000 veces | — | — |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 1 991 | 2 000 veces | — | — |

Las soluciones de $Na_2$EDTA y $FeSO_4$ se preparan por separado, después se reúnen y se esterilizan en autoclave inmediatamente.

Se obtiene así:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 2 l de solución de Fe-EDTA | | 1 000 veces | 20,0 | 5,0 |

*Medios M4 y M7*

Los medios M4 y M7 se preparan a partir de la solución madre II con los macronutrientes y las vitaminas que siguen:

| | Cantidad añadida al agua (mg/l) | Concentración (en relación con el medio M4) | Cantidad de solución madre II añadida para preparar el medio (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| Solución madre II (combinación de oligoelementos) | | 20 veces | 50 | 50 |
| Soluciones madre de macronutrientes (una sola sustancia) | | | | |
| $CaCl_2 \cdot 2H_20$ | 293 800 | 1 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246 600 | 2 000 veces | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58 000 | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2\ SiO_3 \cdot 9H_2O$ | 50 000 | 5 000 veces | 0,2 | 0,2 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |

▼B

| | Cantidad añadida al agua (mg/l) | Concentración (en relación con el medio M4) | Cantidad de solución madre II añadida para preparar el medio (ml/l) | |
|---|---|---|---|---|
| | | | M4 | M7 |
| Solución madre de vitaminas combinadas | — | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |
| La solución madre de vitaminas combinadas se prepara añadiendo las 3 vitaminas a 1 litro de agua como se indica a continuación: | | | | |
| Clorhidrato de tiamina | 750 | 10 000 veces | | |
| Cianocobalamina (B12) | 10 | 10 000 veces | | |
| Biotina | 7,5 | 10 000 veces | | |

La solución madre de vitaminas combinadas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas. Las vitaminas se incorporan a los medios poco antes de usarlos.

*Nota*: Para evitar la precipitación de sales al preparar los medios completos, se incorporan las partes alícuotas de las soluciones madre a aproximadamente 500-800 ml de agua desionizada y a continuación se completa hasta obtener 1 litro.

*Nota*: La primera publicación del medio M4 puede encontrarse en Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in Daphnia magna Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M6

## C.3. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ALGAS Y CIANOBACTERIAS DE AGUA DULCE

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 201 (2006, anexo corregido en 2011). Se ha señalado la necesidad de ampliar el método de ensayo para incluir más especies y actualizarlo para cumplir los requisitos de evaluación del peligro y clasificación de sustancias. Esta revisión se ha efectuado basándose en la amplia experiencia práctica, en los avances científicos en el campo de los estudios toxicológicos de las algas y en la amplia aplicación con fines reglamentarios que ha tenido lugar desde la adopción inicial.

2. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

3. El objeto de este ensayo es determinar los efectos de una sustancia sobre el crecimiento de microalgas o cianobacterias de agua dulce. Los organismos del ensayo, en fase de crecimiento exponencial, se exponen a la sustancia problema en cultivos discontinuos, normalmente durante un plazo de 72 horas. A pesar de la relativamente reducida duración del ensayo, es posible evaluar los efectos sobre varias generaciones.

4. La respuesta del sistema es la reducción del crecimiento en una serie de cultivos de algas (unidades de ensayo) expuestos a distintas concentraciones de una sustancia problema. La respuesta se evalúa como función de la concentración de exposición comparándola con el crecimiento medio en cultivos de control (sin exposición) replicados. Para que se exprese plenamente la respuesta del sistema a los efectos tóxicos (sensibilidad óptima), se permite que los cultivos crezcan exponencialmente sin ninguna restricción, con la presencia de suficientes nutrientes y luz continua durante un tiempo suficiente para medir la reducción de la tasa de crecimiento específico.

5. El crecimiento y su inhibición se cuantifican midiendo la biomasa de las algas en función del tiempo. La biomasa de las algas se define como el peso seco por volumen, por ejemplo mg de algas/litro de solución problema. Sin embargo, es difícil medir el peso seco, por lo que se utilizan parámetros indicadores. De estos indicadores los más utilizados son los recuentos celulares. Otros parámetros indicadores son el volumen celular, la fluorescencia, la densidad óptica, etc. Debe disponerse de un factor de conversión entre el parámetro indicador y la biomasa.

6. El efecto estudiado es la inhibición del crecimiento, expresado como aumento logarítmico de la biomasa (tasa media de crecimiento específico) durante el tiempo de exposición. A partir de las tasas medias de crecimiento específico registradas en una serie de soluciones de ensayo, se determina la concentración que produce una inhibición especificada del x % de la tasa de crecimiento (por ejemplo, del 50 %) y se expresa como $E_rC_x$ (por ejemplo, $E_rC_{50}$).

7. Otra variable de respuesta utilizada en este método de ensayo es el rendimiento, lo que puede ser necesario en algunos países para cumplir obligaciones específicas derivadas de la normativa. Se define como la biomasa al final del tiempo de exposición menos la biomasa al inicio de este tiempo. A partir del rendimiento registrado en una serie de soluciones de ensayo, se calcula la concentración que produce una inhibición especificada del x % del rendimiento (por ejemplo, del 50 %) y se expresa como $E_yC_x$ (por ejemplo, $E_yC_{50}$).

8. Además, pueden determinarse estadísticamente la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y la concentración sin efecto observado (NOEC).

▼M6

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

9. Entre la información sobre la sustancia problema que puede ser útil para establecer las condiciones del ensayo figuran su fórmula estructural, pureza, estabilidad ante la luz, estabilidad en las condiciones del ensayo, propiedades de absorción de la luz, pKa y resultados de estudios de transformación, incluida la biodegradabilidad en el agua.

10. Deben conocerse la hidrosolubilidad, el coeficiente de reparto octanol/agua ($P_{ow}$) y la presión de vapor de la sustancia problema, y debe disponerse de un método validado para cuantificar la sustancia en las soluciones problema con una eficiencia de recuperación y un límite de detección establecidos.

VALIDEZ DEL ENSAYO

11. Para que un ensayo sea válido, su realización debe cumplir los siguientes criterios:

— La biomasa de los cultivos de control debe haber aumentado exponencialmente con un factor de al menos 16 en el plazo de las 72 horas del ensayo. Esto corresponde a una tasa de crecimiento específico de 0,92 días$^{-1}$. Con las especies más utilizadas, la tasa de crecimiento suele ser mucho mayor (véase el apéndice 2). Este criterio puede no cumplirse si se utilizan especies de crecimiento más lento que las indicadas en el apéndice 2. En tal caso, debe prolongarse el plazo de ensayo hasta obtener un crecimiento por un factor de al menos 16 en los cultivos de control, siendo exponencial el crecimiento durante todo este tiempo. El plazo de ensayo puede reducirse hasta un mínimo de 48 horas para mantener el crecimiento exponencial sin límites durante el ensayo, siempre que se cumpla el requisito de un factor de multiplicación mínimo de 16.

— El coeficiente promedio de variación de las tasas de crecimiento específico de cada sección (días 0-1, 1-2 y 2-3, en caso de ensayo de 72 horas) en los cultivos de control (véase «Coeficiente de variación» en el apéndice 1) no debe pasar del 35 %. Para el cálculo de la tasa de crecimiento específico de cada sección, véase el punto 49. Este criterio se aplica al valor promedio de los coeficientes de variación calculados de los cultivos de control replicados.

— El coeficiente de variación de las tasas medias de crecimiento específico durante toda la duración del ensayo en los cultivos de control replicados no debe superar el 7 % en ensayos con *Pseudokirchneriella subcapitata* y *Desmodesmus subspicatus*. Con otras especies menos utilizadas, el valor no debe superar el 10 %.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

12. Para comprobar el procedimiento del ensayo pueden someterse a ensayo una o varias sustancias de referencia, como el 3,5-diclorofenol utilizado en el ensayo interlaboratorios internacional (1). También puede utilizarse el dicromato de potasio como sustancia de referencia con algas verdes. Es aconsejable someter a ensayo una sustancia de referencia al menos dos veces al año.

APLICABILIDAD DEL ENSAYO

13. Este método de ensayo se aplica más fácilmente a las sustancias hidrosolubles que, en las condiciones del ensayo, tienen probabilidad de permanecer en el agua. Para el ensayo de sustancias volátiles, que se adsorben fuertemente, coloreadas, poco hidrosolubles o que pueden afectar a la disponibilidad de nutrientes o minerales en el medio de ensayo, puede ser necesario

▼M6

modificar el procedimiento descrito (por ejemplo, sistema cerrado, acondicionamiento de los recipientes de ensayo). En las referencias (2), (3) y (4) se dan orientaciones sobre algunas modificaciones pertinentes.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

**Equipo**

14. Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con las soluciones de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte. Todos los artículos se lavarán cuidadosamente para que no tengan contaminantes orgánicos ni inorgánicos que puedan interferir con el crecimiento de las algas o con la composición de las soluciones problema.

15. Los recipientes de ensayo serán en principio matraces de vidrio de dimensiones que permitan acoger un volumen suficiente de cultivo para la realización de mediciones durante el ensayo y la entrada de una masa suficiente de $CO_2$ desde la atmósfera (véase el punto 30). Téngase en cuenta que el volumen de líquido debe ser suficiente para que se efectúen las determinaciones analíticas (véase el punto 37).

16. Además, puede hacer falta el siguiente equipo, en todo o en parte:

— Dispositivo de cultivo: se recomienda una cámara o recinto en que se pueda mantener la temperatura elegida de incubación con una precisión de ± 2 °C.

— Instrumentos de medición de la luz: es importante tener en cuenta que el método de medición de la intensidad luminosa y, en particular, el tipo de receptor (colector) pueden afectar al valor medido. Las mediciones deben hacerse preferentemente utilizando un receptor esférico (4 π) (que responda a la luz directa y reflejada desde todos los ángulos por encima y por debajo del plano de medición) o un receptor 2 π (que responda a la luz desde todos los ángulos por encima del plano de medición).

— Dispositivo para determinar la biomasa de las algas. El recuento celular, que es el parámetro indicador más utilizado para determinar la biomasa de las algas, puede efectuarse con un contador electrónico de partículas, un microscopio con cámara de recuento, o un citómetro de flujo. Es posible medir otros parámetros indicadores con un citómetro de flujo, un fluorímetro, un espectrofotómetro o un colorímetro. Es útil calcular un factor de conversión que relacione el recuento celular con el peso seco. Para obtener mediciones útiles con bajas concentraciones de biomasa cuando se utilice un espectrofotómetro, puede ser necesario utilizar cubetas con un paso de luz de 4 cm como mínimo.

**Organismos de ensayo**

17. Pueden utilizarse diversas especies de microalgas y cianobacterias sueltas. Se ha visto que las cepas citadas en el apéndice 2 son adecuadas para el procedimiento especificado en este método de ensayo.

18. Si se utilizan otras especies, debe mencionarse en el informe el nombre o el origen de las cepas. Ha de confirmarse que el crecimiento exponencial de las algas seleccionadas puede mantenerse durante toda la duración del ensayo en las condiciones reinantes.

**Medio de cultivo**

19. Se recomiendan dos medios de cultivo: el medio de la OCDE y el medio AAP. Sus composiciones se muestran en el apéndice 3. Téngase en cuenta que el valor inicial de pH y la capacidad de amortiguación (regulación del aumento del pH) son diferentes en los dos medios. Por tanto, los resultados de los ensayos pueden ser diferentes según el medio utilizado, en particular cuando se estudien sustancias que se ionizan.

▼M6

20. Puede ser necesario modificar los medios de cultivo en ciertos casos, por ejemplo para estudiar metales y agentes quelantes o para efectuar el ensayo a diferentes valores de pH. Si se modifica un medio, es necesario describir con detalle y justificar la modificación (3) (4).

**Concentración inicial de biomasa**

21. La biomasa inicial de los cultivos de ensayo debe ser la misma en todos ellos y lo bastante baja para que pueda darse crecimiento exponencial a lo largo de todo el período de incubación sin peligro de que se agoten los nutrientes. La biomasa inicial no debe superar los 0,5 mg/l en peso seco. Se recomiendan las siguientes concentraciones celulares al inicio:

| | |
|---|---|
| Pseudokirchneriella subcapitata: | $5 \times 10^3 - 10^4$ células/ml |
| Desmodesmus subspicatus: | $2\text{-}5 \times 10^3$ células/ml |
| Navicula pelliculosa: | $10^4$ células/ml |
| Anabaena flos-aquae: | $10^4$ células/ml |
| Synechococcus leopoliensis: | $5 \times 10^4 - 10^5$ células/ml |

**Concentraciones de la sustancia problema**

22. Se pueden efectuar pruebas preliminares para determinar el intervalo de concentraciones en el que es previsible que ocurran los efectos. Para el ensayo definitivo deben seleccionarse al menos cinco concentraciones dispuestas en una progresión geométrica de razón no superior a 3,2. En caso de sustancias problema que presenten una curva concentración-respuesta plana, puede justificarse una razón más elevada. La serie de concentraciones debe abarcar preferentemente el intervalo que provoca una inhibición del 5 a 75 % de la tasa de crecimiento de las algas.

**Réplicas y controles**

23. Cada concentración de ensayo contará con tres réplicas. Si no es necesario determinar la NOEC, el diseño de la prueba puede modificarse para aumentar el número de concentraciones y reducir el número de réplicas por concentración. El número de réplicas de control debe ser como mínimo de tres, aunque se recomienda que sea el doble del número de réplicas utilizadas con cada concentración de ensayo.

24. Puede prepararse una serie aparte de soluciones problema para efectuar las determinaciones analíticas de las concentraciones de la sustancia problema (véanse los puntos 36 y 38).

25. Cuando se utiliza un disolvente para solubilizar la sustancia problema, el diseño del ensayo debe incluir controles adicionales con el disolvente a la misma concentración utilizada en los cultivos de ensayo.

**Preparación del cultivo de inóculo**

26. Para adaptar las algas a las condiciones del ensayo y garantizar que se encuentran en fase de crecimiento exponencial cuando se utilicen para inocular las soluciones problema, debe prepararse un cultivo de inóculo en el medio de ensayo de 2 a 4 días antes del inicio del ensayo. La biomasa de las algas debe ajustarse para que se dé crecimiento exponencial en el cultivo de inóculo hasta que empiece el ensayo. El cultivo de inóculo se incuba en las mismas condiciones que los cultivos de ensayo. Ha de medirse el aumento de la biomasa en el cultivo de inóculo para asegurarse de que el

▼M6

crecimiento está en el intervalo normal de la cepa utilizada en las condiciones de cultivo aplicadas. En el apéndice 4 se describe un ejemplo de procedimiento de cultivo de algas. Para evitar divisiones celulares sincrónicas durante el ensayo, puede ser necesario efectuar una segunda fase de propagación del cultivo de inóculo.

**Preparación de las soluciones problema**

27. Todas las soluciones problema deben contener las mismas concentraciones de medio de cultivo y la misma biomasa inicial de algas. Las soluciones problema de las concentraciones elegidas se preparan normalmente mezclando una solución madre de la sustancia problema con medio de cultivo y con cultivo de inóculo. En principio, estas soluciones madre se preparan disolviendo la sustancia en medio de ensayo.

28. Pueden utilizarse disolventes (por ejemplo, acetona, alcohol t-butílico y dimetil-formamida) como vehículo para añadir al medio de ensayo sustancias poco hidrosolubles (2) (3). La concentración del disolvente no debe superar los 100 µl/l, y debe ser igual en todos los cultivos (incluidos los controles) de la serie de ensayo.

**Incubación**

29. Los recipientes de ensayo deben taparse con tapones permeables al aire. Se agitan los recipientes y se colocan en el dispositivo de cultivo. Durante el ensayo es necesario mantener las algas en suspensión y facilitar el paso del $CO_2$, por lo que debe efectuarse una agitación constante. Los cultivos deben mantenerse a una temperatura entre los 21 y los 24 °C, con variaciones máximas de ± 2 °C. En caso de especies distintas de las indicadas en el apéndice 2 como, por ejemplo, especies tropicales, puede ser apropiada una temperatura superior, siempre que se puedan cumplir los criterios de validez. Se recomienda distribuir aleatoriamente los matraces en la incubadora y cambiarlos de posición cada día.

30. El pH del medio de control no debe subir más de 1,5 unidades durante el ensayo. En caso de metales y sustancias que se ionicen parcialmente a un pH próximo al del ensayo, puede ser necesario limitar la variación de pH para obtener unos resultados reproducibles y bien definidos. Técnicamente puede conseguirse una variación < 0,5 unidades de pH procurando una entrada suficiente de $CO_2$ a la solución problema desde la atmósfera ambiente, por ejemplo aumentando la intensidad de la agitación. Otra posibilidad es contener la demanda de $CO_2$ reduciendo la biomasa inicial o la duración del ensayo.

31. La superficie en que se incuban los cultivos debe recibir una iluminación fluorescente uniforme y continua, por ejemplo del tipo «blanca fría» o «diurna». Las necesidades de luz de las algas y cianobacterias varían con la cepa. Debe seleccionarse la intensidad luminosa que sea más adecuada para el organismo utilizado en el ensayo. Si se utilizan las especies recomendadas de algas verdes, la intensidad luminosa al nivel de las soluciones problema debe estar en el intervalo de 60 a 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ cuando se mide en la banda de longitudes de onda correspondiente a la fotosíntesis (400 - 700 nm) utilizando un receptor adecuado. Algunas especies, en particular *Anabaena flos-aquae*, crecen bien con intensidades luminosas más bajas y pueden sufrir daños con intensidades superiores. Para tales especies debe elegirse una intensidad luminosa media en el intervalo de 40 a 60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Con instrumentos de medición de la luz calibrados en luxes, una gama equivalente de 4 440 a 8 880 lux con luz blanca fría corresponde aproximadamente a la intensidad luminosa recomendada de 60 a 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.) En toda la superficie de incubación debe mantenerse la intensidad luminosa dentro de un margen de ± 15 % respecto a la intensidad luminosa media.

▼M6

**Duración del ensayo**

32. La duración del ensayo es en principio de 72 horas. Sin embargo, pueden elegirse duraciones más largas o más breves, siempre que se puedan cumplir todos los criterios de validez del punto 11.

**Mediciones y determinaciones analíticas**

33. La biomasa de las algas de cada matraz se determina al menos una vez al día mientras dure el ensayo. Si se toman con pipeta pequeños volúmenes de la solución problema para efectuar mediciones, dichos volúmenes no deben reponerse.

34. La medición de la biomasa se efectúa por recuento manual de células con microscopio o bien con un contador electrónico de partículas (por recuento de células o biovolumen). Pueden utilizarse otras técnicas como, por ejemplo, la citometría de flujo, la fluorescencia clorofílica *in vitro* o *in vivo* (5) (6), o la densidad óptica, siempre que se pueda demostrar una correlación satisfactoria con la biomasa en todo el intervalo de biomasas correspondiente al ensayo.

35. El pH de las soluciones debe medirse tanto al principio como al final del ensayo.

36. Siempre que se disponga de un método analítico para la determinación de la sustancia problema en el intervalo de concentraciones utilizadas, debe procederse a analizar las soluciones problema para verificar las concentraciones iniciales y el mantenimiento de las concentraciones de exposición durante el ensayo.

37. Puede ser suficiente analizar la concentración de la sustancia problema al inicio y al final del ensayo a una concentración de ensayo baja y a otra alta, así como a una concentración próxima a la $EC_{50}$ prevista, si es probable que las concentraciones de exposición varíen durante el ensayo en menos del 20 % respecto a sus valores nominales. Se recomienda el análisis a todas las concentraciones de ensayo al inicio y al final del ensayo si es poco probable que las concentraciones permanezcan en la banda del 80 al 120 % de su valor nominal. En caso de sustancias problema que sean volátiles, inestables o se adsorban fuertemente, se recomienda tomar muestras adicionales para analizarlas a intervalos de 24 horas durante el período de exposición, a fin de definir mejor las pérdidas de sustancia problema. Para estas sustancias es posible que se necesiten más réplicas. En todos los casos, la determinación de las concentraciones de la sustancia problema solo tendrá que efectuarse en uno de los recipientes replicados de cada concentración de ensayo (o en los contenidos de los recipientes reunidos por replicado).

38. Los medios de ensayo preparados específicamente para el análisis de las concentraciones de exposición durante el ensayo se tratarán de la misma forma que los empleados para el ensayo, es decir, se inocularán con algas y se incubarán en condiciones idénticas. Si hace falta analizar la concentración de la sustancia problema disuelta, puede ser necesario separar las algas del medio. Se recomienda hacer la separación por centrifugación con una fuerza g baja, suficiente para sedimentar las algas.

39. Si está demostrado que la concentración de la sustancia problema se ha mantenido satisfactoriamente a lo largo de todo el ensayo dentro de un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la medida inicialmente, el análisis de los resultados puede basarse en los valores nominales o medidos inicialmente. Si la desviación respecto a la concentración nominal o medida inicialmente no está dentro del intervalo de ± 20 %, el análisis de los resultados debe basarse en la media geométrica de la concentración durante la exposición o en modelos que describan el descenso de la concentración de la sustancia problema (3) (7).

▼M6

40. El ensayo de inhibición del crecimiento de las algas es un sistema de ensayo más dinámico que la mayoría de los otros ensayos de toxicidad acuática a corto plazo. En consecuencia, puede ser difícil definir las concentraciones reales de exposición, especialmente cuando se estudian a baja concentración sustancias que se adsorben. En tales casos, la desaparición de la sustancia problema de la solución por su adsorción a la biomasa de las algas en aumento no significa que se haya separado del sistema de ensayo. Cuando se analice el resultado del ensayo, debe comprobarse si un descenso en la concentración de la sustancia problema a lo largo del ensayo va acompañado por un descenso de la inhibición del crecimiento. En caso afirmativo, puede estudiarse la aplicación de un modelo adecuado que describa el descenso de la concentración de la sustancia problema (7). En caso negativo, puede ser adecuado basar el análisis de los resultados en las concentraciones iniciales (nominales o medidas).

**Otras observaciones**

41. Debe procederse a una observación microscópica para verificar que el aspecto del cultivo de inóculo es normal y sano y detectar un eventual aspecto anormal de las algas (que podría ser debido a la exposición a la sustancia problema) al final del ensayo.

**Ensayo límite**

42. Bajo ciertas circunstancias, por ejemplo cuando un ensayo preliminar indica que la sustancia problema no tiene efectos tóxicos a concentraciones de hasta 100 mg/l, o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo si este valor es más bajo, puede efectuarse un ensayo límite comparando las respuestas de un grupo de control y de un único grupo de tratamiento (100 mg/l o una concentración igual al límite de solubilidad). Se recomienda vivamente que esto se apoye en un análisis de la concentración de exposición. Todas las condiciones de ensayo y criterios de validez antes descritos son aplicables al ensayo límite, con la excepción de que el número de réplicas de tratamiento ha de ser como mínimo de seis. Las variables de respuesta en el grupo de control y en el de tratamiento pueden analizarse mediante un estudio estadístico para comparar las medias, por ejemplo una prueba t de Student. Si las varianzas de los dos grupos son desiguales, debe procederse a una prueba t ajustada para varianzas desiguales.

DATOS E INFORME

**Trazado de las curvas de crecimiento**

43. La biomasa de los recipientes de ensayo puede expresarse en unidades del parámetro indicador utilizado para la medición (por ejemplo, número de células, fluorescencia).

44. Ha de ponerse en un cuadro la concentración estimada de biomasa en los cultivos de ensayo y en los controles, junto con las concentraciones de la sustancia problema y los tiempos de las mediciones, registrados con una resolución mínima de horas completas, para trazar las curvas de crecimiento. En esta primera fase pueden ser útiles tanto las escalas logarítmicas como las lineales, pero las logarítmicas son obligatorias y en general presentan mejor las variaciones del ritmo de crecimiento durante el período de ensayo. Téngase en cuenta que el crecimiento exponencial da una línea recta cuando se representa en escala logarítmica, y que la inclinación de la línea (pendiente) indica la tasa de crecimiento específico.

45. Utilizando las gráficas, ha de comprobarse si los cultivos de control crecen durante todo el ensayo exponencialmente y a la tasa prevista. Deben examinarse críticamente todos los puntos de datos y el aspecto de las gráficas, y ha de comprobarse que no hay errores en los datos en bruto ni en los procedimientos. Se deben comprobar en particular los puntos que parezcan desviarse por un error sistemático. Si está claro que pueden señalarse errores de procedimiento (o considerarse muy probable que los haya habido), el

▼M6

punto de datos concreto se marcará como anómalo y no se incluirá en el posterior análisis estadístico. (Una concentración de algas igual a cero en uno de dos o tres recipientes replicados puede indicar que el recipiente no se había inoculado correctamente, o que se había limpiado mal.) En el informe del ensayo deben constar claramente los motivos para rechazar un punto de datos por ser anómalo. Los motivos aceptados son solo los errores de procedimiento (raros), y no simplemente una mala precisión. Los métodos estadísticos para la detección de puntos anómalos tienen una utilidad limitada con este tipo de problema y no pueden sustituir al juicio de un experto. Es preferible mantener los puntos anómalos (señalados como tales) entre los puntos recogidos en cualquier presentación posterior de los datos en forma de gráfica o de cuadro.

**Variables de respuesta**

46. El objetivo del ensayo es determinar los efectos de la sustancia problema sobre el crecimiento de las algas. El presente método de ensayo describe dos variables de respuesta, ya que las distintas jurisdicciones tienen distintas preferencias y necesidades reglamentarias. Para que los resultados del ensayo sean aceptables en todas las jurisdicciones, los efectos deben evaluarse utilizando las dos variables de respuesta a) y b) que se describen a continuación:

a) Tasa media de crecimiento específico: esta variable de respuesta se calcula basándose en el aumento logarítmico de la biomasa durante el período de ensayo, expresado por día.

b) Rendimiento: esta variable de respuesta es la biomasa al final del ensayo menos la biomasa al inicio.

47. Ha de señalarse que los valores de toxicidad calculados a partir de estas dos variables de respuesta no son comparables y es necesario tener en cuenta esta diferencia cuando se utilicen los resultados del ensayo. Los valores de $EC_x$ basados en la tasa media de crecimiento específico ($E_rC_x$) son normalmente más elevados que los basados en el rendimiento ($E_yC_x$) si se respetan las condiciones del presente método de ensayo, debido al fundamento matemático de los planteamientos respectivos. Esto no debe interpretarse como una diferencia en la sensibilidad de las dos variables de respuesta, sino como una diferencia puramente matemática entre los valores. El concepto de tasa media de crecimiento específico se basa en el modelo general de crecimiento exponencial de las algas en cultivos no limitados, en el que la toxicidad se estima en función de los efectos sobre la tasa de crecimiento, sin depender del nivel absoluto de la tasa de crecimiento específico del control, de la pendiente de la curva concentración-respuesta ni de la duración del ensayo. Por el contrario, los resultados basados en la variable de respuesta «rendimiento» dependen de todas estas otras variables. La $E_yC_x$ depende de la tasa de crecimiento específico de la especie de algas utilizada en cada ensayo y de la tasa máxima de crecimiento específico, que puede variar de una especie a otra e incluso de una cepa a otra. Esta variable de respuesta no debe utilizarse para comparar la sensibilidad de distintas especies o incluso distintas cepas ante un agente tóxico. Aunque científicamente se prefiere el uso de la tasa media de crecimiento específico para estimar la toxicidad, en el presente método de ensayo se incluye también la estimación a partir del rendimiento para cumplir los requisitos reglamentarios vigentes en ciertos países.

**Tasa media de crecimiento**

48. La tasa media de crecimiento específico durante un período determinado se calcula como el incremento logarítmico de la biomasa en cada uno de los recipientes de control y de tratamiento, mediante la siguiente ecuación [1]:

▼**M6**

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{día}^{-1}) \qquad [1],$$

donde:

$\mu_{i-j}$ es la tasa media de crecimiento específico entre el tiempo *i* y el *j*;

$X_i$ es la biomasa en el tiempo *i*;

$X_j$ es la biomasa en el tiempo *j*.

Respecto a cada grupo de tratamiento y de control ha de calcularse un valor medio de la tasa de crecimiento y una estimación de la varianza.

49. La tasa media de crecimiento específico a lo largo de toda la duración del ensayo (en principio, días 0-3) se calcula utilizando como valor inicial la biomasa teórica inoculada en vez de un valor inicial medido, ya que de esta manera puede obtenerse normalmente una precisión mayor. Si el equipo utilizado para la medición de la biomasa permite una determinación suficientemente precisa de la baja biomasa del inóculo (p. ej., citómetro de flujo), entonces puede utilizarse la concentración de biomasa inicial medida. También se determinará la tasa de crecimiento de cada sección, calculada como las tasas de crecimiento específico de cada día durante la realización del ensayo (días 0-1, 1-2 y 2-3) y se examinará si la tasa de crecimiento de los controles permanece constante (véanse los criterios de validez, punto 11). Una tasa específica de crecimiento del día 1 significativamente menor que la tasa media de crecimiento específico total puede indicar que hay una fase de latencia. Aunque es posible minimizar y eliminar prácticamente la fase de latencia en los cultivos de control mediante la propagación adecuada de un precultivo, una fase de latencia en los cultivos de tratamiento puede indicar que se produce una recuperación tras la agresión tóxica inicial o una reducción de la exposición por pérdida de sustancia problema (incluida la sorción en la biomasa de las algas) tras la exposición inicial. Por tanto, puede considerarse la tasa de crecimiento de cada sección para evaluar el efecto de la sustancia problema presente durante el período de exposición. Una diferencia importante entre la tasa de crecimiento de cada sección y la tasa media de crecimiento indica una desviación respecto al crecimiento exponencial constante e impone el examen en detalle de las curvas de crecimiento.

50. El porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento de cada réplica de tratamiento se calcula con la siguiente ecuación [2]:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100 \qquad [2],$$

donde:

$\%\ I_r$ es el porcentaje de inhibición de la tasa media de crecimiento específico;

$\mu_C$ es el valor promedio de la tasa media de crecimiento específico (μ) en el grupo de control;

$\mu_T$ es la tasa media de crecimiento específico en la réplica de tratamiento.

51. Si se utilizan disolventes en la preparación de las soluciones problema, para el cálculo del porcentaje de inhibición deben emplearse controles con disolvente en vez de controles sin disolvente.

**Rendimiento**

52. El rendimiento se calcula restando a la biomasa presente al final del ensayo la biomasa presente al inicio en cada recipiente de los controles y de los tratamientos. Respecto a cada concentración de ensayo y control ha de calcularse un valor promedio del rendimiento con una estimación de la varianza. El porcentaje de inhibición del rendimiento ($\%\ I_y$) puede calcularse de la manera siguiente con cada réplica de tratamiento:

▼M6

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100 \quad [3],$$

donde:

$\%\ I_y$ es el porcentaje de inhibición del rendimiento;

$Y_C$ es el valor promedio del rendimiento en el grupo de control;

$Y_T$ es el valor del rendimiento en la réplica de tratamiento.

**Trazado de la curva concentración-respuesta**

53. Se representa el porcentaje de inhibición frente al logaritmo de la concentración de sustancia problema y se examina la gráfica obtenida, desechando los puntos de datos que se hayan marcado como anómalos en la primera fase. Se ajusta una línea regular a los puntos de datos, visualmente o mediante interpolación con ordenador, para obtener una primera impresión de la relación concentración-respuesta; después se aplica un método más detallado, de preferencia uno estadístico informatizado. En función del uso previsto de los datos, de la calidad (precisión) y cantidad de los mismos, así como de la disponibilidad de herramientas de análisis de los datos, puede decidirse (y a veces justificarse plenamente) terminar en esta fase el análisis de los datos para leer simplemente las cifras clave $EC_{50}$ y $EC_{10}$ (o $EC_{20}$) a partir de la curva ajustada visualmente (véase también el punto siguiente sobre los efectos de estimulación). Pueden considerarse válidas las siguientes razones para no utilizar un método estadístico:

— Los datos no son adecuados para producir, con métodos informatizados, resultados más fiables que los obtenidos por el juicio de un experto; en tales situaciones, es posible incluso que algunos programas informáticos no puedan proporcionar una solución fiable (las iteraciones pueden no converger, etc.).

— Las respuestas de estimulación del crecimiento no pueden tratarse adecuadamente con los programas informáticos disponibles (véase más abajo).

**Procedimientos estadísticos**

54. El objetivo es obtener una relación concentración-respuesta cuantitativa mediante análisis de regresión. Es posible utilizar una regresión lineal ponderada después de haber efectuado una transformación linealizante de los datos de respuesta como, por ejemplo, en probit o logit o unidades Weibull (8), pero son preferibles los procedimientos de regresión no lineal porque con ellos se tratan mejor las inevitables irregularidades de los datos y las desviaciones respecto a distribuciones regulares. Si la inhibición está próxima al 0 o al 100 %, la transformación puede magnificar tales irregularidades, interfiriendo así con el análisis (8). Debe señalarse que los métodos normales de análisis que utilizan las transformaciones en probit, logit o de Weibull están previstos para aplicarse a datos cuánticos (por ejemplo, mortalidad o supervivencia), y que es necesario modificarlos para aplicarlos a datos de crecimiento o biomasa. En las referencias (9), (10) y (11) pueden encontrarse métodos específicos de determinación de los valores de $EC_x$ a partir de datos continuos. En el apéndice 5 se da más información sobre el uso del análisis de regresión no lineal.

55. Respecto a cada variable de respuesta que haya de analizarse, se utilizará la relación concentración-respuesta para calcular estimaciones puntuales de los valores de $EC_x$. Cuando sea posible, se determinarán los límites de confianza del 95 % de cada estimación. La bondad del ajuste de los datos de respuesta al modelo de regresión se evaluará de forma gráfica o estadística. El análisis de regresión se efectuará utilizando las respuestas de las distintas réplicas y no los promedios de los grupos de tratamiento. Si, no obstante, es

▼M6

difícil o imposible el ajuste de una curva no lineal, debido a una dispersión demasiado grande de los datos, el problema puede evitarse efectuando la regresión con promedios de grupos como forma práctica de reducir la influencia de los puntos anómalos sospechados. El recurso a esta opción debe indicarse en el informe del ensayo como desviación del procedimiento normal porque el ajuste de la curva con los valores de las distintas réplicas no llevaba a un buen resultado.

56. Las estimaciones de la $EC_{50}$ y los límites de confianza pueden obtenerse también utilizando la interpolación lineal con remuestreo *(bootstrapping)* (13) si los métodos o modelos de regresión disponibles no son adecuados para los datos.

57. Para la estimación de los valores de LOEC y, por tanto, de NOEC, en relación con los efectos de la sustancia problema sobre la tasa de crecimiento, es necesario comparar los promedios de tratamiento utilizando técnicas de análisis de la varianza (ANOVA). A continuación se ha de comparar el promedio obtenido a cada concentración con el del control, aplicando un método apropiado de comparación múltiple o de prueba de tendencia. Pueden ser útiles las pruebas de Dunnett o Williams (12) (14) (15) (16) (17). Hay que comprobar si se sostiene la hipótesis del ANOVA de homogeneidad de la varianza. Esta comprobación puede realizarse gráficamente o mediante una prueba en regla (17). Son adecuadas las pruebas de Levene o Bartlett. El incumplimiento de la hipótesis de homogeneidad de las varianzas puede corregirse a veces mediante la transformación logarítmica de los datos. Si la heterogeneidad de la varianza es extrema y no puede corregirse mediante transformación, ha de considerarse la posibilidad de efectuar un análisis por métodos como las pruebas de tendencia de Jonkheere de ajuste secuencial. En (11) puede encontrarse más información sobre la determinación de la NOEC.

58. Los recientes avances científicos han llevado a recomendar el abandono del concepto de NOEC para sustituirlo por el de estimaciones puntuales de $EC_x$ basadas en la regresión. Aún no se ha determinado un valor adecuado de x para esta prueba con algas. Parece que es apropiado el intervalo del 10 al 20 % (según la variable de respuesta elegida) y lo mejor es indicar tanto la $EC_{10}$ como la $EC_{20}$.

**Estimulación del crecimiento**

59. A veces se observa una estimulación del crecimiento (inhibición negativa) a bajas concentraciones. Esto puede deberse a la hormesis («estimulación tóxica») o a la adición de factores estimulantes del crecimiento al poner el material problema en el medio mínimo utilizado. Téngase en cuenta que la adición de nutrientes inorgánicos no debería tener ningún efecto directo porque el medio de ensayo ha de presentar un exceso de nutrientes a lo largo de todo ensayo. Normalmente, la estimulación a dosis bajas puede ignorarse al calcular la $EC_{50}$, salvo en casos extremos. Sin embargo, cuando sea extrema o deba calcularse un valor de $EC_x$ para una x baja, puede ser necesario aplicar algún procedimiento especial. Siempre que sea posible debe evitarse la eliminación de las respuestas de estimulación del análisis de datos, y, si los programas informáticos disponibles para el ajuste de las curvas no son capaces de aceptar una estimulación poco importante, puede utilizarse la interpolación lineal con remuestreo (*bootstrapping*). Si la estimulación es extrema, puede considerarse la aplicación de un modelo de hormesis (18).

**Inhibición del crecimiento de origen no tóxico**

60. Los materiales problema que absorben la luz pueden producir una reducción de la tasa de crecimiento porque el sombreado que provocan reduce la cantidad disponible de luz. Tales efectos de tipo físico deben distinguirse de los efectos tóxicos mediante la modificación de las condiciones del ensayo y deben figurar aparte en los informes. Puede encontrarse información al respecto en las referencias (2) y (3).

INFORME DEL ENSAYO

61. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

▼**M6**

*Sustancia problema:*

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes, incluido el límite de hidrosolubilidad,

— datos de identificación de la sustancia (por ejemplo, número CAS), incluida la pureza (impurezas).

*Especie de ensayo:*

— cepa, proveedor u origen y condiciones de cultivo aplicadas.

*Condiciones de ensayo:*

— fecha de inicio y duración del ensayo;

— descripción del diseño del ensayo: recipientes de ensayo, volúmenes de cultivo, densidad de biomasa al inicio del ensayo,

— composición del medio,

— concentraciones de ensayo y réplicas (por ejemplo, número de réplicas en paralelo, número de concentraciones de ensayo y progresión geométrica utilizada),

— descripción de la preparación de las soluciones de ensayo, incluido el uso de disolventes, etc.,

— dispositivo de cultivo,

— intensidad y calidad de la luz (fuente, homogeneidad),

— temperatura,

— concentraciones estudiadas: concentraciones nominales de ensayo y eventuales resultados de análisis para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo; deben comunicarse la eficiencia de recuperación del método y el límite de cuantificación de la matriz de ensayo,

— todas las desviaciones respecto al presente método de ensayo,

— método de determinación de la biomasa y pruebas de la correlación entre el parámetro medido y el peso seco.

*Resultados:*

— valores de pH al inicio y al final del ensayo en todos los recipientes de tratamiento,

— biomasa de cada matraz en cada punto de medida y método de medición de la biomasa,

— curvas de crecimiento (gráfica de la biomasa frente al tiempo),

— variables de respuesta calculadas de cada réplica de tratamiento, con valores medios y coeficiente de variación de las réplicas;

— representación gráfica de la relación concentración-efecto,

▼M6

— estimaciones de la toxicidad correspondientes a las variables de respuesta como, p. ej., $EC_{50}$, $EC_{10}$, $EC_{20}$, e intervalos de confianza asociados; en caso de que se calculen la LOEC y la NOEC, se indicarán sus valores y los métodos estadísticos utilizados en su determinación,

— si se ha utilizado el ANOVA, el tamaño del efecto que puede observarse (por ejemplo, la diferencia significativa mínima),

— la eventual estimulación del crecimiento que se haya observado en cualquier recipiente de tratamiento;

— cualquier otro efecto observado como, por ejemplo, cambios morfológicos de las algas,

— discusión de los resultados, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Organización Internacional de Normalización (1993). ISO 8692. Calidad del agua. Ensayo de inhibición del crecimiento de algas.

(2) Organización Internacional de Normalización (1998). ISO/DIS 14442. Calidad del agua. Guía general para los ensayos de inhibición del crecimiento de algas con materiales poco solubles, compuestos volátiles, metales y agua residual.

(3) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, No. 23. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, París.

(4) Organización Internacional de Normalización (1998). ISO 5667-16: Calidad del agua. Muestreo. Parte 16: Orientaciones sobre el bioensayo de las muestras.

(5) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. *Water Research* 31: 2525-2531.

(6) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. (1997). In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22: 919-925.

(7) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L., and Batley, G.E. (2003). Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. *Microbiol. Lett., Suppl. Chem.* 22: 2073-2079.

(8) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19: 713-718.

(9) Nyholm, N., Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 157-167.

(10) Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem*. 11: 1485-1494.

(11) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, París.

▼**M6**

(12) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc*. 50: 1096-1121.

(13) Norberg-King, T.J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(15) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(16) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 519-531.

(17) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, Nueva York.

(18) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

*Apéndice 1*

**Definiciones**

En relación con el presente método de ensayo se aplicarán las siguientes definiciones y abreviaturas:

**Biomasa**: peso seco de materia viva presente en una población y expresado en términos de un volumen dado como, por ejemplo, mg de algas por litro de solución problema. Generalmente, la «biomasa» se define como masa, pero en este ensayo la palabra se refiere a masa por volumen. También en este ensayo, lo que se mide normalmente son indicadores de la biomasa, como recuentos celulares, fluorescencia, etc., por lo que el término de «biomasa» se refiere también a estos indicadores.

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**Coeficiente de variación**: medida adimensional de la variabilidad de un parámetro, definida como el cociente entre la desviación típica y la media. Puede expresarse también como valor porcentual. El valor promedio del coeficiente de variación de una tasa media de crecimiento específico en cultivos de control replicados (en paralelo) debe calcularse de la manera siguiente:

1. Se calcula el coeficiente de variación porcentual de la tasa media de crecimiento específico a partir de las tasas de crecimiento diarias (de cada sección) en las réplicas respectivas.

2. Se calcula el valor medio de todos los valores calculados según el guion anterior para obtener el coeficiente medio de variación de la tasa de crecimiento específico diaria (de cada sección) en las réplicas de los cultivos de control.

**$EC_x$**: concentración de la sustancia problema disuelta en el medio de ensayo que produce una reducción del x % (por ejemplo, del 50 %) en el crecimiento del organismo de ensayo dentro de un plazo de exposición definido (que debe indicarse explícitamente si es distinto de la duración completa o normal del ensayo). Para expresar de forma inequívoca el valor de EC obtenido a partir de la tasa de crecimiento o del rendimiento, se usan respectivamente los símbolos «$E_rC$» y «$E_yC$».

**Medio de cultivo**: medio de cultivo sintético y completo en que crecen las algas del ensayo cuando se exponen a la sustancia problema. Esta se disuelve en principio en el medio de ensayo.

**Tasa de crecimiento** (tasa media de crecimiento específico): aumento logarítmico de la biomasa durante el período de exposición.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: concentración estudiada mínima a la que se observa que la sustancia ejerce un efecto estadísticamente significativo de reducción del crecimiento (con $p < 0,05$) cuando se compara con el control, dentro de un tiempo de exposición dado. Sin embargo, es necesario también que todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC ejerzan un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: concentración estudiada que se encuentra inmediatamente por debajo de la LOEC.

**Variable de respuesta**: variable para la estimación de la toxicidad derivada de cualquier parámetro medido que describa la biomasa por distintos métodos de cálculo. A efectos del presente método, las tasas de crecimiento y el rendimiento son variables de respuesta obtenidas midiendo la biomasa directamente o bien mediante alguno de los parámetros indicadores mencionados.

▼M6

**Tasa de crecimiento específico**: variable de respuesta definida como el cociente de la diferencia de los logaritmos neperianos de un parámetro de observación (en el presente método de ensayo, la biomasa) y el respectivo plazo de tiempo.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Rendimiento**: valor de una variable de medición al final del período de exposición menos el valor de la variable de medición al inicio del período de exposición; indica el aumento de biomasa durante el ensayo.

▼M6

*Apéndice 2*

**Cepas conocidas por ser adecuadas para el ensayo**

***Algas verdes***

*Pseudokirchneriella subcapitata* (antes conocida como *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG

*Desmodesmus subspicatus* (antes conocida como *Scenedesmus subspicatus*) 86.81 SAG

***Diatomeas***

*Navicula pelliculosa*, UTEX 664

***Cianobacterias***

*Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A

*Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

**Orígenes de las cepas**

Las cepas recomendadas pueden conseguirse en forma de cultivos procedentes de una sola célula de alga en las siguientes colecciones (por orden alfabético):

ATCC: American Type Culture Collection
10801 University Boulevard
Manassas, Virginia 20110-2209
Estados Unidos

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa
Institute of Freshwater Ecology
Windermere Laboratory
Far Sawrey, Amblerside
Cumbria LA22 0LP
Reino Unido

SAG: Collection of Algal Cultures
Inst. Plant Physiology
Universität Göttingen
Nikolausberger Weg 18
37073 Gotinga
ALEMANIA

UTEX Culture Collection of Algae
Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology
School of Biological Sciences
The University of Texas at Austin
Austin, Tejas 78712
EE.UU.

▼M6

**Aspecto y características de las especies recomendadas**

| | *P. subcapitata* | *D. subspicatus* | *N. pelliculosa* | *A. flos-aquae* | *S. leopoliensis* |
|---|---|---|---|---|---|
| Aspecto | Células curvadas y retorcidas, aisladas | Células ovales, en su mayoría aisladas | Barras o varillas | Cadenas de células ovales | Barras o varillas |
| Tamaño (longitud × anchura) µm | 8-14 × 2-3 | 7-15 × 3-12 | 7,1 × 3,7 | 4,5 × 3 | 6 × 1 |
| Volumen celular ($\mu m^3$/célula) | 40-60 (1) | 60-80 (1) | 40-50 (1) | 30-40 (1) | 2,5 (2) |
| Peso seco celular (mg/célula) | $2\text{-}3 \times 10^{-8}$ | $3\text{-}4 \times 10^{-8}$ | $3\text{-}4 \times 10^{-8}$ | $1\text{-}2 \times 10^{-8}$ | $2\text{-}3 \times 10^{-9}$ |
| Tasa de crecimiento (3) ($día^{-1}$) | 1,5-1,7 | 1,2-1,5 | 1,4 | 1,1-1,4 | 2,0-2,4 |

(1) Medido con un contador electrónico de partículas.
(2) Calculado a partir del tamaño.
(3) Tasa de crecimiento observada con mayor frecuencia en el medio de la OCDE con una intensidad luminosa aproximada de 70 µE · $m^{-2}$ $s^{-1}$ y 21 °C.

**Recomendaciones específicas de cultivo y manipulación de las especies de ensayo recomendadas**

***Pseudokirchneriella subcapitata y Desmodesmus subspicatus***

Generalmente es fácil mantener estas algas verdes en diversos medios de cultivo. Las colecciones de cultivos proveen de información sobre los medios adecuados. Las células están normalmente aisladas, y las mediciones de la densidad celular pueden efectuarse fácilmente con un contador electrónico de partículas o un microscopio.

***Anabaena flos-aquae***

Pueden utilizarse diversos medios de cultivo para mantener un cultivo madre. Es especialmente importante evitar que el cultivo discontinuo pase de la fase logarítmica de crecimiento al renovarse, ya que la recuperación es difícil después.

*Anabaena flos-aquae* forma agregados de cadenas encajadas de células. El tamaño de estos agregados puede cambiar según las condiciones de cultivo. Puede ser necesario romper estos agregados si, para determinar la biomasa, se hace un recuento con microscopio o se utiliza un contador electrónico de partículas.

Es posible someter submuestras a un baño de ultrasonidos para romper las cadenas, a fin de reducir la variabilidad del recuento. Si el baño dura más tiempo del necesario para romper las cadenas en segmentos más cortos, puede que se destruyan las células. La intensidad y la duración del baño de ultrasonidos deben ser las mismas con todos los recipientes de tratamiento.

Debe contarse un número suficiente de campos en el hemocitómetro (al menos 400 células) para compensar la variabilidad. Así mejora la fiabilidad de las determinaciones de densidad efectuadas con el microscopio.

Para la determinación del volumen celular total de *Anabaena* puede utilizarse un contador electrónico de partículas tras romper las cadenas de células mediante un baño de ultrasonidos aplicado cuidadosamente. Es necesario ajustar la energía de los ultrasonidos para evitar destruir las células.

Utilícese un agitador vórtex o un método similar adecuado a fin de que la suspensión de algas utilizada para inocular los recipientes de ensayo esté bien mezclada y sea homogénea.

▼**M6**

Los recipientes de ensayo deben colocarse en un agitador orbital o recíproco, a unas 150 revoluciones por minuto. Otra posibilidad es utilizar una agitación intermitente para reducir la tendencia de *Anabaena* a agregarse. Si se produce la agregación, hay que tener cuidado para tomar muestras representativas con el fin de medir la biomasa. Para romper los agregados de algas puede ser necesario agitar vigorosamente antes de tomar la muestra.

***Synechococcus leopoliensis***

Pueden utilizarse diversos medios de cultivo para mantener un cultivo madre. Las colecciones de cultivos proveen de información sobre los medios adecuados.

*Synechococcus leopoliensis* crece en forma de células aisladas de forma cilíndrica. Las células son muy pequeñas, lo que hace difícil utilizar el recuento con microscopio para medir la biomasa. Son útiles los contadores electrónicos de partículas equipados para contar partículas de hasta un tamaño aproximado de 1 μm. También puede aplicarse la técnica de medición fluorométrica in vitro.

***Navicula pelliculosa***

Pueden utilizarse diversos medios de cultivo para mantener un cultivo madre. Las colecciones de cultivos proveen de información sobre los medios adecuados. Obsérvese el requisito de que el medio tenga silicato.

*Navicula pelliculosa* puede formar agregados en ciertas condiciones de crecimiento. Debido a la producción de lípidos, las células de las algas tienden a veces a acumularse en la película superficial. En tales circunstancias, hay que adoptar medidas especiales cuando se toman submuestras para la determinación de la biomasa a fin de que las muestras sean representativas. Puede ser necesario agitar enérgicamente, por ejemplo utilizando un mezclador vórtex.

▼M6

*Apéndice 3*

**Medios de cultivo**

Puede utilizarse uno de los dos medios de cultivo siguientes:

— Medio de la OCDE: medio original de las directrices de ensayo de la OCDE TG 201, también de acuerdo con la norma ISO 8692

— Medio AAP de la EPA de Estados Unidos, también de acuerdo con la ASTM.

Para preparar estos medios deben utilizarse sustancias de grado analítico o reactivo y agua desionizada.

**Composición del medio AAP (EPA de Estados Unidos) y del medio OCDE TG 201**

| Componente | AAP | | OCDE | |
|---|---|---|---|---|
| | mg/l | mM | mg/l | mM |
| $NaHCO_3$ | 15,0 | 0,179 | 50,0 | 0,595 |
| $NaNO_3$ | 25,5 | 0,300 | | |
| $NH_4Cl$ | | | 15,0 | 0,280 |
| $MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$ | 12,16 | 0,0598 | 12,0 | 0,0590 |
| $CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$ | 4,41 | 0,0300 | 18,0 | 0,122 |
| $MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$ | 14,6 | 0,0592 | 15,0 | 0,0609 |
| $K_2HPO_4$ | 1,044 | 0,00599 | | |
| $KH_2PO_4$ | | | 1,60 | 0,00919 |
| $FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$ | 0,160 | 0,000591 | 0,0640 | 0,000237 |
| $Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$ | 0,300 | 0,000806 | 0,100 | 0,000269* |
| $H_3BO_3$ | 0,186 | 0,00300 | 0,185 | 0,00299 |
| $MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$ | 0,415 | 0,00201 | 0,415 | 0,00210 |
| $ZnCl_2$ | 0,00327 | 0,000024 | 0,00300 | 0,0000220 |
| $CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$ | 0,00143 | 0,000006 | 0,00150 | 0,00000630 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$ | 0,00726 | 0,000030 | 0,00700 | 0,0000289 |
| $CuCl_2 \cdot 2(H_2O)$ | 0,000012 | 0,00000007 | 0,00001 | 0,00000006 |
| pH | 7,5 | | 8,1 | |

La proporción molar del EDTA respecto al hierro sobrepasa ligeramente la unidad. Así se evita la precipitación del hierro y, a la vez, se reduce al mínimo la quelación de iones de metales pesados.

En el ensayo con la diatomea *Navicula pelliculosa*, ambos medios deben recibir un suplemento de $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ para obtener una concentración de 1,4 mg Si/l.

▼**M6**

El pH del medio se mide cuando se ha alcanzado el equilibrio entre el carbonato del medio y la presión parcial de $CO_2$ del aire atmosférico. He aquí la relación aproximada entre el pH a 25 °C y la concentración molar de bicarbonato:

$pH_{eq} = 11{,}30 + \log [HCO_3]$

Con 15 mg $NaHCO_3$/l, $pH_{eq}$ = 7,5 (medio de la EPA de Estados Unidos) y con 50 mg $NaHCO_3$/l, $pH_{eq}$ = 8,1 (medio de la OCDE).

**Composición en elementos de los medios de ensayo**

| Elemento | AAP | OCDE |
|---|---|---|
| | mg/l | mg/l |
| C | 2,144 | 7,148 |
| N | 4,202 | 3,927 |
| P | 0,186 | 0,285 |
| K | 0,469 | 0,459 |
| Na | 11,044 | 13,704 |
| Ca | 1,202 | 4,905 |
| Mg | 2,909 | 2,913 |
| Fe | 0,033 | 0,017 |
| Mn | 0,115 | 0,115 |

**Preparación del medio de la OCDE**

| Nutriente | Concentración en la solución madre |
|---|---|
| Solución madre 1: macronutrientes | |
| $NH_4Cl$ | 1,5 g/l |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,2 g/l |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 1,8 g/l |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1,5 g/l |
| $KH_2PO_4$ | 0,16 g/l |
| Solución madre 2: hierro | |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 64 mg/l |
| $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 100 mg/l |
| Solución madre 3: oligoelementos | |
| $H_3BO_3$ | 185 mg/l |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 415 mg/l |
| $ZnCl_2$ | 3 mg/l |

▼**M6**

| Nutriente | Concentración en la solución madre |
|---|---|
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,5 mg/l |
| $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,01 mg/l |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 7 mg/l |
| Solución madre 4: bicarbonato | |
| $NaHCO_3$ | 50 g/l |
| $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ | |

Las soluciones madre se esterilizan mediante filtración por membrana (diámetro medio de poro 0,2 μm) o en autoclave (120 °C, 15 min). Las soluciones se guardan en la oscuridad a 4 °C.

Las soluciones madre 2 y 4 no deben esterilizarse en autoclave, sino mediante filtración por membrana.

El medio de cultivo se prepara añadiendo a agua un volumen adecuado de las soluciones madre 1 a 4:

A 500 ml de agua esterilizada se añaden:

10 ml de solución madre 1,

1 ml de solución madre 2,

1 ml de solución madre 3,

1 ml de solución madre 4,

Se enrasa a 1 000 ml con agua esterilizada.

Hay que dejar un tiempo suficiente para que el medio llegue al equilibrio con el $CO_2$ de la atmósfera, en caso necesario burbujeando durante varias horas aire esterilizado por filtración.

**Preparación del medio de la EPA de Estados Unidos**

1. Se añade 1 ml de cada solución madre de *2.1-2.7* a unos 900 ml de agua destilada o desionizada y después se diluye hasta 1 litro.

2. Se preparan soluciones madre de macronutrientes disolviendo las siguientes sustancias en 500 ml de agua destilada o desionizada. Los reactivos *2.1, 2.2, 2.3* y *2.4* pueden combinarse en una única solución madre.

| | | |
|---|---|---|
| 2.1. | $NaNO_3$ | 12,750 g |
| 2.2. | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 6,082 g |
| 2.3. | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 2,205 g |
| 2.4. | Solución madre de micronutrientes (véase 3). | |
| 2.5. | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 7,350 g |
| 2.6. | $K_2HPO_4$ | 0,522 g |
| 2.7. | $NaHCO_3$ | 7,500 g |
| 2.8. | $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$ | Véase la nota 1. |

▼**M6**

*Nota 1:* Utilícese solo para el ensayo con especies de diatomeas. Puede añadirse directamente (202,4 mg) o en forma de solución madre para dar una concentración final de Si en el medio de 20 mg/l.

3. La solución madre de micronutrientes se prepara disolviendo las siguientes sustancias en 500 ml de agua destilada o desionizada:

| | | |
|---|---|---|
| 3.1. | $H_3BO_3$ | 92,760 mg |
| 3.2. | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 207,690 mg |
| 3.3. | $ZnCl_2$ | 1,635 mg |
| 3.4. | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 79,880 mg |
| 3.5. | CoCl2 · 6H2O | 0,714 mg |
| 3.6. | $CaCl_4 \cdot 2H_2O$ | 3,630 mg |
| 3.7. | $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,006 mg |
| 3.8. | $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 150,000 mg [(etilendinitrilo)tetraacetato de disodio]. |
| 3.9. | $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,005 mg. Véase la nota 2. |

*Nota 2:* Utilícese solo en el medio para los cultivos madre de especies de diatomeas.

4. Se ajusta el pH a 7,5 ± 0,1 con NaOH o HCl 0,1 N o 1,0 N.

5. Se pasan los medios a un recipiente estéril a través de un filtro de membrana de 0,22 μm si se va a utilizar un contador de partículas o de un filtro de 0,45 μm en caso contrario.

6. Los medios se guardan en la oscuridad a unos 4 °C hasta que se vayan a utilizar.

▼M6

*Apéndice 4*

**Ejemplo de procedimiento para el cultivo de algas**

**Observaciones generales**

El objetivo del cultivo mediante el siguiente procedimiento es el de obtener cultivos de algas para ensayos de toxicidad.

Utilícense métodos apropiados que garanticen que los cultivos de algas no están infectados con bacterias. Puede ser conveniente utilizar cultivos axénicos, pero se deben obtener y utilizar cultivos procedentes de una sola célula de alga.

Todas las operaciones deben llevarse a cabo en condiciones estériles, con el fin de evitar la contaminación con bacterias u otras algas.

**Equipo y material**

Véase el epígrafe «Equipo» del método de ensayo.

**Procedimiento para la obtención de algas**

*Preparación de soluciones nutritivas (medios)*

Todas las sales nutrientes del medio se preparan como soluciones madre concentradas y se mantienen en lugar fresco y oscuro. Estas soluciones se esterilizan por filtración o en autoclave.

El medio se prepara añadiendo a agua destilada estéril la cantidad correcta de solución madre, teniendo cuidado de que no se produzca ninguna contaminación. Para conseguir un medio sólido se añade un 0,8 % de agar.

*Cultivos madre*

Los cultivos madre son pequeños cultivos de algas que se trasfieren periódicamente a un medio fresco para hacer de material inicial del ensayo. Si los cultivos no se utilizan regularmente, se extienden en tubos de agar inclinado. Estos cultivos se transfieren a medio fresco al menos cada dos meses.

Los cultivos madre se cultivan en matraces Erlenmeyer que contienen un volumen de unos 100 ml de medio apropiado. Cuando las algas se incuban a 20 °C con iluminación continua, será necesario hacer una transferencia semanal.

En este pase se transfiere una cantidad del cultivo «viejo» con pipetas estériles a un matraz de medio fresco, de forma que la concentración inicial en caso de una especie de rápido crecimiento sea unas 100 veces menor que en el cultivo viejo.

La tasa de crecimiento de una especie puede determinarse a partir de la curva de crecimiento. Si se conoce, será posible calcular la densidad a la cual deberá transferirse el cultivo al medio nuevo. Esto deberá realizarse antes de que el cultivo alcance su fase letal.

*Precultivo*

El objetivo del precultivo es obtener una cantidad apropiada de algas para la inoculación de los cultivos de ensayo. Dicho precultivo debe incubarse en las condiciones del ensayo y utilizarse cuando esté aún en fase de crecimiento exponencial, normalmente después de un período de incubación de 2 a 4 días. Si los cultivos de algas contienen células deformadas o anormales, deberán eliminarse.

▼M6

*Apéndice 5*

**Análisis de datos por regresión no lineal**

**Consideraciones generales**

La respuesta en los ensayos con algas y otros ensayos de crecimiento microbiano (incremento de biomasa) es por su naturaleza una variable continua o métrica: la tasa de un proceso si se utiliza la tasa de crecimiento, o su integral a lo largo del tiempo si se elige la biomasa. Ambas tienen como referencia la respuesta promedio correspondiente de unos controles no expuestos, en réplicas paralelas, que muestran una respuesta máxima en las condiciones aplicadas, siendo la luz y la temperatura los principales factores que influyen en el ensayo de las algas. El sistema es distribuido u homogéneo y la biomasa puede considerarse como un continuo sin tener en cuenta las células en sí. La distribución de la varianza del tipo de respuesta de un sistema de estas características depende solo de los factores experimentales (lo que se describe típicamente con una distribución de errores normal o logarítmico-normal). Esto contrasta con las respuestas típicas de bioensayos con datos cuánticos, respecto a los cuales se supone con frecuencia que el componente dominante de la varianza es la tolerancia (con una distribución típicamente binomial) de cada uno de los organismos. Las respuestas del control en este caso son nulas o están a nivel de fondo.

En la situación sin complicación, la respuesta normalizada o relativa, r, disminuye de forma monótona desde 1 (inhibición nula) hasta 0 (inhibición del 100 %). Obsérvese que todas las respuestas tienen un error asociado, y que es posible calcular inhibiciones negativas aparentes solo como resultado de errores aleatorios.

**Análisis de regresión**

*Modelos:*

El objeto de un análisis de regresión es describir cuantitativamente la curva concentración-respuesta en forma de una función de regresión matemática $Y = f(C)$ o, más frecuentemente, $F(Z)$, donde $Z = \log C$. De forma inversa $C = f^{-1}(Y)$ permite calcular valores de $EC_x$, como las $EC_{50}$, $EC_{10}$ y $EC_{20}$, y sus límites de confianza del 95 %. Se ha visto que algunas funciones matemáticas simples describen bien las relaciones concentración-respuesta obtenidas en los ensayos de inhibición del crecimiento de las algas. Entre estas funciones figuran, por ejemplo, la ecuación logística, la ecuación asimétrica de Weibull y la función de distribución logarítmico-normal, todas las cuales son curvas sigmoideas que se aproximan asintóticamente a cero cuando $C \rightarrow 0$, y a uno cuando $C \rightarrow$ infinito.

Recientemente se ha propuesto el uso de modelos de función de umbral continua (por ejemplo, el modelo de Kooijman «de inhibición del crecimiento de la población», Kooijman *et al.*, 1996) como alternativa a los modelos asintóticos Este modelo supone que no hay efectos a concentraciones por debajo de cierto umbral, $EC_0+$, que se estima mediante extrapolación de la relación concentración-respuesta hasta su intersección con el eje de las concentraciones utilizando una función continua simple que no es diferenciable en el punto inicial.

Obsérvese que el análisis puede ser una simple minimización de las sumas de los cuadrados residuales (suponiendo una varianza constante) o cuadrados ponderados si se compensa la heterogeneidad de la varianza.

*Procedimiento*

El procedimiento puede describirse de la manera siguiente. Se selecciona una ecuación funcional apropiada, $Y = f(C)$, y se ajusta a los datos mediante regresión no lineal. Es mejor utilizar las mediciones de cada matraz en lugar de los promedios de las réplicas, a fin de obtener de los datos el máximo de información posible. Por otra parte, si la varianza es alta, la experiencia práctica

▼M6

sugiere que los valores promedios de las réplicas pueden dar una estimación matemática más sólida, menos influida por los errores sistemáticos de los datos, que si se atiende a cada uno de los puntos de datos.

Se representan la curva ajustada y los datos medidos, y se examina si es adecuado el ajuste de la curva. El análisis de los valores residuales puede ser una herramienta muy útil a este respecto. Si la relación funcional elegida para ajustar la relación concentración-respuesta no describe bien toda la curva o alguna parte fundamental de ella, como la respuesta a concentraciones bajas, debe elegirse otra opción de ajuste de la curva como, por ejemplo, una curva asimétrica del tipo de la función de Weibull, en lugar de una simétrica. Las inhibiciones negativas pueden ser un problema, por ejemplo con la función de distribución logarítmico-normal, y también en este caso ha de aplicarse otra función de regresión. No se recomienda asignar un valor cero ni uno positivo pequeño a tales valores negativos porque así se distorsiona la distribución del error. Puede ser adecuado hacer ajustes distintos en partes de la curva tales como la de inhibición baja para calcular $EC_x$ con bajos valores de x. A partir de la ecuación ajustada se calculan [por «estimación inversa», $C = f^{-1}(Y)$] unas estimaciones de varias $EC_x$ en puntos característicos y se comunican como mínimo las estimaciones de $EC_{50}$ y de una o dos $EC_x$ con x bajo. La experiencia en la práctica demuestra que la precisión del ensayo de las algas suele permitir una estimación razonablemente exacta del nivel de inhibición del 10 % si hay suficientes puntos de datos, salvo que haya estimulación a bajas concentraciones, lo que sería un factor de confusión. La precisión de una estimación de $EC_{20}$ suele ser bastante mejor que la de una $EC_{10}$, porque la $EC_{20}$ suele corresponder a la parte aproximadamente lineal del centro de la curva concentración-respuesta. A veces es difícil interpretar la $EC_{10}$ debido a una estimulación del crecimiento. Así pues, aunque la $EC_{10}$ se puede obtener normalmente con suficiente exactitud, se recomienda asimismo indicar siempre la $EC_{20}$.

*Factores de ponderación*

La varianza experimental no es constante en general e incluye típicamente un componente proporcional, por lo que es mejor efectuar sistemáticamente una regresión ponderada. Se acepta normalmente que los factores de ponderación de un análisis de este tipo son inversamente proporcionales a la varianza:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Muchos programas de regresión permiten la opción de hacer un análisis de regresión ponderada con los factores de ponderación incluidos en un cuadro. Es conveniente normalizar los factores de ponderación multiplicándolos por $n/\Sigma w_i$ (n es el número de puntos de datos) de forma que su suma sea igual a uno.

*Respuestas de normalización*

La normalización por la respuesta promedio de control plantea varios problemas de principio y ocasiona una estructura de varianza bastante compleja. Al dividir las respuestas por la respuesta promedio del control para obtener el porcentaje de inhibición, se introduce un error más debido al error del promedio del control. Salvo que este error sea despreciable, es necesario corregir los factores de ponderación de la regresión y los límites de confianza para tener en cuenta la covarianza con el control (Draper y Smith, 1981). Obsérvese que es importante una elevada precisión del promedio estimado de la respuesta del control a fin de minimizar la varianza general de la respuesta relativa. La varianza se indica a continuación:

(el subíndice i se refiere al nivel de concentración i y el subíndice 0 a los controles)

$$Yi = \text{Respuesta relativa} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

▼**M6**

con una varianza $Var(Y_i) = Var(r_i/r_0) \cong (\partial Yi / \partial r_i)^2 \cdot Var(r_i) + ((\partial Y_i/ \partial r_0)^2 \cdot Var(r_0)$

y como $(\partial Y_i/ \partial r_i) = 1/r_0$ y $(\partial Y_i/ \partial r_0) = r_i/r_0^2$

con una distribución normal de los datos y las réplicas $m_i$ y $m_0$: $Var(r_i) = \sigma^2/m_i$

la varianza total de la respuesta relativa, $Y_i$, se convierte entonces en:

$$Var(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 \cdot m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 \cdot m_0$$

El error en el promedio del control es inversamente proporcional a la raíz cuadrada del número de réplicas del control contabilizadas para la media, y a veces se puede justificar la inclusión de datos de antecedentes y, así, reducir mucho el error. Otra posibilidad consiste en no normalizar los datos y ajustar las respuestas absolutas, con inclusión de los datos de la respuesta del control, pero introduciendo el valor de la respuesta del control como parámetro adicional que debe ajustarse con regresión no lineal. Con una ecuación usual de regresión de 2 parámetros, este método necesita el ajuste de 3 parámetros, por lo que exige más puntos de datos que la regresión no lineal de datos que se normalizan mediante una respuesta del control preestablecida.

*Intervalos de confianza inversos*

El cálculo de intervalos de confianza de regresión no lineal por estimación inversa es bastante complejo y no es una opción frecuentemente disponible en los paquetes normales de programas informáticos de estadística. Pueden obtenerse unos límites de confianza aproximados con programas normales de regresión no lineal con reparametrización (Bruce y Versteeg, 1992), lo que implica reescribir la ecuación matemática con las estimaciones de los puntos deseados, por ejemplo, la $EC_{10}$ y la $EC_{50}$ como parámetros que deben estimarse. [Sea la función $I = f(\alpha, \beta,$ concentración) y utilícense las relaciones de la definición $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0{,}1$ y $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0{,}5$ para sustituir $f(\alpha, \beta,$ concentración) por una función equivalente $g(EC_{10}, EC_{50},$ concentración.]

Se realiza un cálculo más directo (Andersen *et al.*, 1998) manteniendo la ecuación original y utilizando un desarrollo de Taylor en torno a los promedios de $r_i$ y $r_0$.

Últimamente se han popularizado los «métodos de remuestreo» (*bootstrap*). Tales métodos utilizan los datos medidos y un remuestreo frecuente dirigido por un generador de números aleatorios para calcular una distribución empírica de la varianza.

BIBLIOGRAFÍA

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, 30, 1625-1632.

Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, Nueva York.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 1485-1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998). Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. *Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics*, 3, 405-420.

▼B

## C.4. DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD «FACIL»

### PARTE I. CONSIDERACIONES GENERALES

#### I.1. INTRODUCCIÓN

Se describen seis métodos de ensayo que permiten detectar la biodegradabilidad fácil de los productos químicos en medio acuoso aerobio;

a) pérdida de carbono orgánico disuelto (COD) (Método C.4-A);

b) prueba de detección de la OCDE modificada — Pérdida de COD (Método C.4-B);

c) desprendimiento de dióxido de carbono ($CO_2$) (prueba de Sturm modificada) (Método C.4-C);

d) respirometría manométrica (Método C.4-D);

e) frasco cerrado (Método C.4-E);

f) MITI (Ministerio de Industria y Comercio Internacional de Japón) (Método C.4-F).

En la Parte I del presente método se recogen consideraciones generales y consideraciones comunes a los seis ensayos. Los aspectos específicos de los distintos métodos se tratan en las partes II a VII. Los anexos contienen definiciones, fórmulas y material complementario.

Un estudio comparativo interlaboratorios, realizado por la OCDE en 1988, demostró la homogeneidad de los resultados obtenidos con estos métodos. Sin embargo, las características físicas de la sustancia problema pueden hacer que se prefiera un método a los otros.

#### I.2. SELECCIÓN DEL MÉTODO ADECUADO

Para seleccionar el método más adecuado es fundamental poseer información sobre la solubilidad, presión de vapor y características de absorción del producto químico. Debería conocerse la estructura química o la fórmula para calcular los valores teóricos o comprobar los valores obtenidos en las mediciones de parámetros, como DTO, $CO_2$T, COD, COT o DQO (véanse los anexos I y II).

Las sustancias problema con una hidrosolubilidad no inferior a 100 mg/l pueden estudiarse con cualquier método, siempre que no sean volátiles ni sufran absorción. En el cuadro 1 se indican los métodos adecuados para los productos químicos poco hidrosolubles, volátiles o que sufran absorción. En el anexo III se describe cómo pueden tratarse las sustancias poco hidrosolubles y las volátiles. Las sustancias moderadamente volátiles pueden estudiarse con el método de pérdida de COD si hay bastante espacio para el gas en los recipientes utilizados (que debieran estar convenientemente cerrados). En este caso, es necesario utilizar un control abiótico para tener en cuenta las posibles pérdidas físicas.

▼B

*Cuadro 1*

**Aplicabilidad de los métodos de ensayo**

| Prueba | Método analítico | Adecuación para sustancias: | | |
|---|---|---|---|---|
| | | poco solubles | volátiles | absorbibles |
| Pérdida de COD | Carbono orgánico disuelto | — | — | +/- |
| Pérdida OECD modificada | Carbono orgánico disuelto | — | — | +/- |
| Desprendimiento de $CO_2$ | Respirometría: desprendimiento de $CO_2$ | + | — | + |
| Respirometría manométrica | Respirometría manométrica: consumo de oxígeno | + | +/- | + |
| Frasco cerrado | Respirometría: oxígeno disuelto | +/- | + | + |
| MITI | Respirometría: consumo de oxígeno | + | +/- | + |

Es necesario disponer de información sobre la pureza o las proporciones relativas de los principales componentes del producto problema para interpretar los resultados obtenidos, especialmente cuando estos son bajos o dudosos.

El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para bacterias (anexo IV) puede ser muy útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de la biodegradación.

I.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Para comprobar el procedimiento se someten a ensayo sustancias de referencia que cumplan los criterios de biodegradabilidad fácil; para ello se introduce, en paralelo con el ensayo a realizar, una muestra con la sustancia de referencia adecuada.

La anilina (recién destilada), el acetato sódico y el benzoato sódico son sustancias adecuadas. Todas estas sustancias de referencia se degradan con estos métodos aunque no se añada inóculo deliberadamente.

Se pensó en buscar una sustancia de referencia que fuera fácilmente biodegradable pero que necesitara para su biodegradación la adición de inóculo. Se ha propuesto el uso del ftalato ácido de potasio pero es necesario disponer de más información sobre esta sustancia antes de que pueda ser aceptada como sustancia de referencia.

En el ensayo respirométrico, los compuestos que contengan nitrógeno pueden afectar a la captación de oxígeno debido a la nitrificación (véanse los anexos II y V).

I.4. PRINCIPIO DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO

Se inocula una solución o suspensión de la sustancia problema en un medio mineral y se incuba en condiciones aerobias en la oscuridad o bajo luz difusa. La cantidad de COD en la solución problema debida al inóculo debería mantenerse lo más baja posible respecto a la cantidad de COD debida a la sustancia problema. Para tener en cuenta la actividad endógena del inóculo, se realizan ensayos paralelos en blanco, que contienen inóculo pero sin sustancia problema, si bien la actividad endógena de las células en presencia de la sustancia no corresponderá exactamente con la del control endógeno. Se trabajará en paralelo con una sustancia de referencia para controlar el funcionamiento de los procedimientos.

▼B

En general, la degradación se sigue mediante la determinación de parámetros, como el COD, la producción de $CO_2$ y el consumo de oxígeno, tomando medidas con la frecuencia suficiente para permitir la identificación del comienzo y de la finalización de la biodegradación. Con los respirómetros automáticos, la medición es continua. El COD se mide a veces junto con otro parámetro, pero esto suele hacerse solo al principio y al final del ensayo. También puede utilizarse el análisis químico específico para evaluar la degradación primaria de la sustancia problema y determinar la concentración de las sustancias intermedias formadas eventualmente (esto es obligatorio en la prueba del MITI).

El ensayo dura normalmente 28 días. Sin embargo, es posible terminar los ensayos antes del día 28, por ejemplo en el caso de que la curva de biodegradación haya alcanzado un nivel constante en, al menos, 3 determinaciones. También es posible prolongar los ensayos mas de 28 días cuando la curva indique que la biodegradación se ha iniciado pero sin que se haya alcanzado el nivel constante el día 28.

I.5. CRITERIOS DE CALIDAD

I.5.1. **Reproducibilidad**

Debido a la naturaleza de la biodegradación y de las poblaciones bacterianas mixtas utilizadas como inóculos, las determinaciones deben realizarse al menos por duplicado.

La experiencia indica que la variación entre duplicados será menor cuanto mayor sea la concentración de microorganismos añadida inicialmente al medio de ensayo. También se ha visto en estudios interlaboratorios que pueden darse grandes variaciones entre los resultados obtenidos por diferentes laboratorios; no obstante, con los compuestos químicos que son fácilmente biodegradables se obtienen normalmente resultados concordantes.

I.5.2. **Validez del ensayo**

Un ensayo se considera válido si la máxima diferencia entre los duplicados respecto a los valores de la eliminación de la sustancia problema en la parte de la gráfica en forma de meseta, al final del test o al final del período de diez días, es inferior al 20 % y si la degradación porcentual de la sustancia de referencia alcanza el nivel de biodegradabilidad fácil antes de los 14 días. Si no se cumple alguna de estas condiciones, es necesario repetir el ensayo. Debido al rigor de los métodos, la obtención de bajos porcentajes de biodegradación no significa necesariamente que la sustancia problema no sea biodegradable en condiciones ambientales, sino que indica que será necesario realizar más estudios para establecer la biodegradabilidad.

Si en un ensayo de toxicidad, realizado con la sustancia problema junto con una sustancia de referencia, se obtiene en 14 días menos del 35 % de degradación (según el COD) o menos del 25 % (según la DTO o el $CO_2$T), se supone que la sustancia de ensayo es inhibidora (véase también el anexo IV). La serie de ensayo debe repetirse, a ser posible, utilizando una concentración inferior de sustancia problema o una concentración superior de inóculo, que no exceda de 30 mg de sólidos/litro.

I.6. PREPARATIVOS Y PROCEDIMIENTOS GENERALES

En el cuadro 2 se resumen las condiciones generales aplicables a los ensayos. El material y las demás condiciones experimentales relativas específicamente a un ensayo concreto se describen después bajo el título de cada ensayo.

▼B

*Cuadro 2*

**Condiciones de los ensayos**

| Ensayo | Perdida de DOC | Desprendimiento de $CO_2$ | Respiración manométrica | Detección de la OCDE modificada | Frasco cerrado | MITI-(I) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentración de sustancia problema | | | | | | |
| mg/l | | | 100 | | 2-10 | 100 |
| mg COD/l | 10-40 | 10-20 | | 10-40 | | |
| mg DTO/l | | | 50-100 | | 5-10 | |
| Concentración de inóculo (en células/l, aproximadamente) | ≤ 30 mg/l SS o ≤ 100 ml efluente/l ($10^7$-$10^8$) | | | 0,5 ml efluente secundario/l ($10^5$) | ≤ 5 ml efluente/l ($10^4$-$10^6$) | 30mg/l SS ($10^7$-$10^8$) |
| Concentración de elementos en el medio mineral (en mg/1): | | | | | | |
| P | 116 | | | | 11,6 | 29 |
| N | 1,3 | | | | 0,13 | 1,3 |
| Na | 86 | | | | 8,6 | 17,2 |
| K | 122 | | | | 12,2 | 36,5 |
| Mg | 2,2 | | | | 2,2 | 6,6 |
| Ca | 9,9 | | | | 9,9 | 29,7 |
| Fe | 0,05-0,1 | | | | 0,05-0,1 | 0,15 |
| pH | 7,4 ± 0,2 | | | | | preferentemente 7,0 |
| Temperatura | 22 ± 2 °C | | | | | 25 ± 1 °C |

COD = Carbono orgánico disuelto DTO = Demanda teórica de oxígeno SS = Sólidos en suspensión

I.6.1. **Agua de dilución**

Se usará agua desionizada o destilada, exenta de sustancias tóxicas (por ejemplo, iones $Cu^{+\ +}$) a concentraciones inhibidoras. No debe contener más del 10 % del contenido en carbono orgánico introducido por la sustancia problema. Esta elevada pureza del agua es necesaria para no obtener valores elevados en la prueba en blanco. La contaminación puede proceder de impurezas inherentes, y también, de las resinas cambiadoras de iones y de residuos materiales procedentes de bacterias y algas. Para cada serie de ensayos debe utilizarse un solo lote de agua, comprobado previamente mediante análisis de COD. Esta comprobación no es necesaria para el ensayo del frasco cerrado, pero el consumo de oxígeno del agua debe ser bajo.

▼B

I.6.2. **Soluciones madre de elementos minerales**

Las soluciones de ensayo se prepararán a partir de soluciones madre de elementos minerales en concentración adecuada. Las siguientes soluciones madre pueden utilizarse (con diferentes factores de dilución) en los métodos de pérdida de COD, detección de la OCDE modificada, desprendimiento de $CO_2$, respirometria manométrica y frasco cerrado.

Los factores de dilución y, en el caso de la prueba MITI, la preparación específica del medio mineral se recogen bajo el encabezamiento de cada prueba específica.

*Soluciones madre:*

Hay que preparar las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de grado analítico.

| | | |
|---|---|---|
| a) | Ortofosfato diácido de potasio, $KH_2PO_4$ | 8,50 g |
| | Ortofosfato ácido de potasio, $K_2HPO_4$ | 21,75 g |
| | Ortofosfato ácido de, sodio dihidratado $Na_2HPO_4$ . 2 $H_2O$ | 33,40 g |
| | Cloruro amónico, $NH_4CL$ | 0,50 g |
| | Disolver en agua y enrasar a 1 litro. El pH de la solución debe ser 7,4 | |
| b) | Cloruro calcico, anhidro, $CaCl_2$ o | 27,50 g |
| | Cloruro cálcico dihidratado, $CaCl_2$ - 2 $H_2O$ | 36,40 g |
| | Disolver en agua y enrasar a 1 litro | |
| c) | Sulfato magnésico heptahidratado, $MgSO_4$ . 7 $H_2O$ | 22,50 g |
| | Disolver en agua y enrasar a 1 litro | |
| d) | Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $FeCl_3$. 6 $H_2O$ | 0,25 g |
| | Disolver en agua y enrasar a 1 litro | |

*Nota:* Con el fin de no tener que preparar esta solución inmediatamente antes de su uso, añádase una gota de HC1 concentrado o 0,4 g de EDTA (sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético) por litro.

I.6.3. **Soluciones madre de productos químicos**

Por ejemplo, disolver de 1 a 10 g, según se considere adecuado, de sustancia problema o de referencia en agua desionizada y enrasar a 1 litro cuando la solubilidad sea superior a 1 g/l. En caso contrario, preparar soluciones madre en el medio mineral o añadir los productos químicos directamente en el medio mineral. Para el tratamiento de productos químicos menos solubles, véase el anexo III, pero teniendo en cuenta que en la prueba del MITI (Método C.4-F) no pueden utilizarse ni disolventes ni emulgentes.

▼B

I.6.4. **Inóculos**

El inóculo puede proceder de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes (no cloradas), aguas superficiales, suelos o una mezcla de todo ello. En el caso de los ensayos de pérdida de COD, desprendimiento del $CO_2$ y respirometría manométrica, si se utiliza lodo activado, este debe proceder de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Se ha visto que los inóculos procedentes de otras fuentes dan resultados más dispersos. En el caso de la prueba de detección de la OCDE modificada y de la prueba de frasco cerrado, es necesario un inóculo más diluido sin flóculos de lodo y la fuente preferida es un efluente secundario procedente de una depuradora de aguas residuales domésticas o de una instalación de laboratorio. En el caso del método MITI, el inóculo se obtiene mezclando material procedente de distintas fuentes y se describe bajo el encabezamiento específico de esta prueba.

I.6.4.1. *Inóculo procedente de lodos activados*

Se recoge una muestra de lodo activado recién obtenido del depósito de aireación de una planta depuradora de aguas residuales o de una instalación de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas. En caso necesario, se retiran las partículas gruesas, por filtración a través de un tamiz fino y a continuación se mantiene el lodo en condiciones aerobias.

Otra posibilidad es dejar sedimentar o centrifugar (por ejemplo, a 1 100 g durante 10 minutos) después de eliminar las posibles partículas gruesas. Se desecha el sobrenadante. El lodo puede ser lavado en el medio mineral. Se suspende el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/1 y se somete a aireación hasta que se utilice.

El lodo debería obtenerse de una planta convencional que trabaje adecuadamente. Si tiene que obtenerse el lodo de una planta depuradora de elevado rendimiento o cuando se píense que contiene inhibidores, debería lavarse el lodo. El lodo resuspendido se mezcla bien y se deja sedimentar o se centrifuga, se desecha el sobrenadante del lodo lavado y se vuelve a resuspender en otro volumen de medio mineral. Este procedimiento se repite hasta que se considere que el lodo queda exento de un exceso de sustrato o de inhibidores.

Después de conseguir la resuspensión completa, o con el lodo sin tratar, se toma una muestra justo antes de su utilización para determinar el peso seco de los sólidos en suspensión.

Otra posibilidad diferente es homogeneizar el lodo activado (de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/1). Se trata el lodo en un agitador mecánico durante 2 minutos a velocidad media. El lodo agitado se deja sedimentar durante 30 minutos, o más en caso necesario, y se decanta el líquido para utilizarlo como inóculo en la proporción de 10 ml/l de medio mineral.

I.6.4.2. *Otras fuentes de inóculos*

Este inóculo puede obtenerse a partir del efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Se toma una muestra reciente y se mantiene en condiciones aerobias durante el transporte. Se deja sedimentar durante 1 hora o se filtra a través de papel de filtro grueso y el efluente decantado o el filtrado se mantiene en condiciones aerobias hasta su utilización. Pueden utilizarse hasta 100 ml de este tipo de inóculo por cada litro de medio.

▼B

Otra fuente adicional de inóculo es el agua superficial. En este caso, se recoge una muestra de un agua superficial adecuada como, por ejemplo, ríos o lagos, y se mantiene en condiciones aerobias hasta su utilización. En caso necesario, se concentra el inóculo por filtración o centrifugación.

I.6.5. **Acondicionamiento previo de los inóculos**

Los inóculos pueden estar preacondicionados a las condiciones experimentales, pero no preadaptados a la sustancia problema. El acondicionamiento previo consiste en la aireación del lodo activado en medio mineral o bien del efluente secundario durante 5 o 7 días a la temperarura del ensayo. El acondicionamiento previo mejora a veces la precisión de los métodos de ensayo reduciendo los valores del blanco. El acondicionamiento previo se considera innecesario para el inóculo del MITI.

I.6.6. **Controles abióticos**

Cuando sea necesario, se estudiará la posible degradación abiótica de la sustancia problema determinando la eliminación de COD, el consumo de oxígeno o el desprendimiento de dióxido de carbono en controles estériles que no contengan inóculo. La esterilización se consigue mediante filtración a través de membrana (0,2-0,45 micrómetros) o mediante la adición de una sustancia tóxica adecuada a la concentración conveniente. Si se utiliza una membrana de filtración, coger las muestras de forma aséptica para mantener la esterilidad. A no ser que la absorción de la sustancia problema haya sido excluida de antemano, las pruebas en las que se mide la biodegradación como la eliminación de COD, especialmente con lodo activado como inóculo, debieran incluir un control abiótico inoculado v envenenado.

I.6.7. **Número de frascos**

El número de frascos en un ensayo normal se describe bajo el encabezamiento de cada ensayo.

Pueden utilizarse los siguientes tipos de frasco:

— Suspensión de ensayo: conteniendo la sustancia problema y el inóculo.

— Inóculo aislado: conteniendo únicamente inóculo.

— Control del procedimiento: conteniendo sustancia problema e inóculo.

— Control estéril abiótico: estéril, conteniendo la sustancia problema (véase el punto I.6.6).

— Control de absorción: conteniendo la sustancia problema, inóculo y agente esterilizante.

— Control de toxicidad: conteniendo la sustancia problema, la sustancia de referencia e inóculo.

La determinación en la suspensión de ensayo y la determinación en el inóculo aislado deberían realizarse obligatoriamente en paralelo. Es aconsejable realizar las determinaciones en los otros frascos también en paralelo.

Sin embargo, esto puede no ser siempre posible. Hay que asegurarse de que se toman bastantes muestras o lecturas para tener la certeza de que se alcanza el porcentaje de eliminación adecuado durante el período de tiempo de 10 días.

▼B

I.7 DATOS Y EVALUACIÓN

Para el cálculo de $D_t$, degradación porcentual, se utilizan los valores medios de las medidas de los parámetros, realizadas por duplicado en los dos recipientes del ensayo y en el blanco. Las fórmulas vienen dadas en las secciones específicas correspondientes a cada ensayo. El curso de la degradación se representa gráficamente y se indica el período de observación de 10 días. Se calcula y se registra la pérdida porcentual al final del período de observación de 10 días y el valor en la fase estacionaria o al final del ensayo, según se considere adecuado.

En los ensayos respirométricos, los compuestos nitrogenados pueden afectar al consumo de oxígeno debido a la nitrificación (véanse los anexos II y V).

I.7.1. **Medida de la degradación basada en la determinación del COD**

El porcentaje de degradación ($D_t$) en cada momento en que se tome una muestra debiera calcularse separadamente para los frascos conteniendo la sustancia problema, utilizando los valores medios de las medidas por duplicado del COD con el fin de valorar la validez de la prueba (véase el punto 1.5.2). Se calcula utilizando la siguiente ecuación:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

donde:

$D_t$ = degradación porcentual en el tiempo t.

$C_o$ = concentración media inicial de COD en el medio de cultivo inoculado con la sustancia problema (mg COD/l),

$C_t$ = concentración media de COD en el medio de cultivo inoculado con sustancia problema en el tiempo t (mg COD/l),

$C_{bo}$ = concentración media inicial de COD en el medio mineral en blanco inoculado (mg COD/l),

$C_{bt}$ = concentración media de COD en el medio mineral en blanco inoculado, en el tiempo t (mg COD/l).

Todas las concentraciones son las obtenidas experimentalmente.

I.7.2. **Degradación medida por análisis específicos**

Cuando se tienen datos analíticos específicos, la biodegradación primaria se calcula con la fórmula siguiente:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

donde:

$D_t$ = degradación porcentual en el tiempo t, normalmente 28 días

$S_a$ = cantidad residual de sustancia problema en el medio inoculado al final de la prueba (mg)

$S_b$ = cantidad residual de sustancia problema en la prueba en blanco con agua o medio a los que solo se ha añadido la sustancia problema (mg).

▼B

I.7.3. **Degradación abiótica**

Cuando se utilice un control abiótico estéril, calcular el porcentaje de degradación abiótica utilizando:

$$\% \text{ abioticdegradation} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

Donde:

$C_{s(o)}$ = concentración COD en el control estéril el día 0,

$C_{s(t)}$ = concentración COD en el control estéril el día t.

I.8. INFORME

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

— sustancias problema y de referencia así como su pureza,

— condiciones del ensayo,

— inóculo: naturaleza y lugar o lugares de recogida, concentración y posible tratamiento de acondicionamiento previo,

— proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se conocen,

— tiempo de duración del ensayo y temperatura a la que se ha realizado,

— en caso de sustancias problema poco solubles, tratamiento realizado,

— método de ensayo utilizado; motivos científicos y explicación en caso de que se haya realizado algún cambio en el procedimiento,

— ficha de recogida de datos,

— cualquier fenómeno de inhibición que se haya observado,

— cualquier degradación abiótica que se haya observado,

— datos químicos analíticos específicos, si se tienen,

— datos analíticos sobre los intermediarios, si se tienen,

— gráfica de la degradación porcentual frente al tiempo para las sustancias problema y de referencia; hay que indicar claramente la fase de latencia, la fase de degradación, el período de observación de 10 días y la pendiente (anexo I). Si la prueba ha cumplido con los criterios de validez, podrá utilizarse para la gráfica la media de los porcentajes de degradación de los frascos que contengan la sustancia problema,

— porcentaje de eliminación obtenido después del período de observación de 10 días, en la fase estacionaria y al final de la prueba.

PARTE II. **ENSAYO BASADO EN LA PÉRDIDA DE COD** (Método C.4-A)

II.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Un volumen medido de medio mineral inoculado con una concentración conocida de la sustancia problema (10-40 mg COD/l) como única fuente nominal de carbono orgánico se somete a aireación en la oscuridad o bajo luz difusa a 22 ± 2 °C.

▼B

La degradación se va siguiendo mediante el análisis del COD a intervalos frecuentes durante un período de 28 días. El grado de biodegradación se calcula expresando la concentración de COD eliminada (corregida con los valores obtenidos en el blanco con inóculo) como porcentaje de la concentración presente inicialmente. El grado de biodegradación primaria también puede calcularse mediante análisis químico complementario realizado al principio y al final de la incubación.

II.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

II.2.1. **Equipo**

a) Matraces cónicos, por ejemplo de 250 ml hasta 2 l, según el volumen necesario para los análisis de COD.

b) Agitador para matraces cónicos, bien con control automático de la temperatura o bien situado en una sala a temperatura constante. La agitación debe ser suficiente como para mantener condiciones aerobias en todos los matraces.

c) Equipo de filtración con membranas adecuadas.

d) Analizador de COD.

e) Equipo para determinar el oxígeno disuelto.

f) Centrífuga.

II.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de la solución madre, véase el punto I.6.2.

Se mezclan 10 ml de solución (a) con 800 ml de agua de dilución, se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 l con agua de dilución.

II.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4, I.6.4.I, I.6.4.2 y I.6.5.

II.2.4. **Preparación de los matraces**

Como ejemplo, se introducen alícuotas de 800 ml de medio mineral en matraces cónicos de 2 litros y se añaden volúmenes suficientes de las soluciones madre de las sustancias problema y de referencia a los distintos matraces para obtener una concentración de sustancia equivalente a 10-40 mg COD/l. Controlar los valores del pH y ajustar a 7,4 si es necesario. Se inoculan los matraces con lodo activado u otra fuente de inóculo (véase el punto I.6.4), para obtener una concentración final que no exceda de 30 mg de sólidos en suspensión/1. También hay que preparar controles del inóculo en el medio mineral pero sin sustancia problema ni de referencia.

En caso necesario, puede utilizarse un recipiente para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema inoculando una solución que contenga, en el medio mineral, concentraciones comparables tanto de la sustancia problema como de la sustancia de referencia.

También, en caso necesario, puede prepararse otro matraz estéril para observar si la sustancia problema se degrada abióticamente. Para ello, se utiliza una solución de la sustancia problema sin inoculo (véase el punto 1.6.6).

▼B

Además, si se sospecha que la sustancia problema puede adsorberse de forma significativa en las paredes o fondo del recipiente utilizado para la realización del ensayo, en los lodos, etc., hay que hacer una evaluación previa para determinar la importancia de la adsorción y, en consecuencia, la idoneidad de la prueba para esa sustancia (véase el cuadro 1). Preparar un matraz conteniendo la sustancia problema, el inoculo y el agente esterilizante.

Todos los matraces se enrasan a 1 l con medio mineral y, tras mezclar, se toma una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD (véase el anexo II.4). Por ejemplo, se tapa la boca de los matraces con papel de aluminio, de forma que se permita la libre circulación de aire entre el matraz y la atmósfera ambiente. A continuación se ponen los recipientes en el agitador para iniciar el ensayo.

II.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

Matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

Matraz 5: control de procedimiento

Preferentemente y cuando sea necesario:

Matraz 6: control estéril abiótico

Matraz 7: control de adsorción

Matraz 8: control de toxicidad.

Véase también el punto 1.6.7.

II.2.6. **Realización del ensayo**

A lo largo de todo el ensayo, hay que determinar la concentración de COD en cada matraz por duplicado a intervalos de tiempo conocidos con la suficiente frecuencia para poder determinar el principio del período de observación de 10 días y la pérdida porcentual al final de dicho período de 10 días. Debe limitarse al mínimo el volumen de suspensión problema tomado para cada determinación.

Antes de tomar las muestras, hay que compensar las pérdidas por evaporación de los matraces añadiendo agua de dilución (véase el anexo I.6.1) en la cantidad necesaria. Antes de tomar las muestras hay que homogeneizar bien el medio de cultivo y asegurarse de que el material que se adhiere a las paredes de los recipientes se disuelve o resuspende. Inmediatamente después de tomar la muestra, esta se filtra por membrana o se centrifuga (véase el anexo II.4). La muestra filtrada o centrifugada se analiza el mismo día; en caso contrario, se conserva a 2-4 $^{o}$C durante un máximo de 48 horas, o por debajo de -18 $^{o}$C durante un período mayor.

II.3. DATOS E INFORME

II.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Calcular la degradación porcentual al tiempo t según se indica en el punto I.7.1. (determinación de COD) y, de forma optativa, en el punto I.7.2 (análisis específico).

Todos los resultados deben registrarse en las fichas de recogida de datos presentadas.

▼B

II.3.2. **Validez de los resultados.**

Véase el punto I.5.2.

II.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

II.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de la ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE PÉRDIDA DE COD

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:…

Concentración de la solución madre: … mg/l en sustancia química

Concentración inicial en el medio, $t_o$: … mg/l en sustancia química

4. **INÓCULO**

Fuente:…

Tratamiento realizado:

Acondicionamiento previo en su caso:…

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de ensayo: … mg/l

5. **DETERMINACIONES DE CARBONO**

Analizador de carbono:

| | Matraz nº | | COD tras n días (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Substancia problema más inóculo | 1 | $a_1$ | | | | | |
| | | $a_2$ | | | | | |
| | | a, media $C_{a(t)}$ | | | | | |
| | 2 | $b_2$ | | | | | |
| | | $b_2$ | | | | | |
| | | b, media $C_{b(t)}$ | | | | | |

▼B

| | Matraz nº | | COD tras n días (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Ensayo en blanco con inóculo pero sin substancia problema | 3 | $c_2$ | | | | | |
| | | $c_2$ | | | | | |
| | | c, media $C_{b(t)}$ | | | | | |
| | 4 | $d_2$ | | | | | |
| | | $d_2$ | | | | | |
| | | d, media $C_{b(t)}$ | | | | | |
| | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |

6. **EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS**

| Matraz nº | | % de degradación tras n días | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_4$ |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| Media (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Si existe una diferencia considerable entre $D_1$ y $D_2$, no debe calcularse el término medio.

*Nota:* Pueden utilizarse fórmulas similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad.

7. **CONTROL ABIóTICO** (optativo)

| | Tiempo (días) | |
|---|---|---|
| | 0 | t |
| conc. de COD (mg/l) en el control estéril | $C_{s(o)}$ | |

$$\% \text{ dedegradación abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO** (optativo)

| | Cantidad residual de la substancia química al final de la prueba (mg/l) | % degradacíon |
|---|---|---|
| Control estéril | $S_b$ | |

▼B

| | Cantidad residual de la substancia química al final de la prueba (mg/l) | % degradacíon |
|---|---|---|
| Prueba con el media inoculado | $S_a$ | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

PARTE III. **ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA OCDE MODIFICADO** (Método C.4-B)

III. 1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Un volumen medido de medio mineral con una concentración conocida de la sustancia problema (10-40 mg COD/l) como única fuente nominal de carbono orgánico se inocula con 0,5 ml de efluente por litro de medio. La mezcla se airea en la oscuridad o bajo luz difusa a 22 ± 2 °C.

La degradación se va siguiendo mediante análisis del COD a intervalos frecuentes a lo largo de un período de 28 días. El grado de biodegradación se calcula expresando la concentración de COD eliminado (corregida con los valores obtenidos en el blanco con inoculo) como porcentaje de la concentración presente inicialmente. El grado de biodegradación primaria también puede calcularse a partir de análisis químicos suplementarios realizados al principio y al final de la incubación.

III.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

III.2.1. Equipo

a) Matraces cónicos, por ejemplo de 250 ml a 2 l, según el volumen necesario para el análisis de COD.

b) Agitador para matraces cónicos, bien con control automático de temperatura o bien situado en una sala de temperatura constante. La agitación debe ser suficiente como para mantener condiciones aerobias en todos los matraces.

c) Equipo de filtración con membranas adecuadas.

d) Analizador de COD.

e) Equipo para determinar el oxígeno disuelto.

f) Centrífuga.

III.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de la solución madre, véase el punto I.6.2.

Se mezclan 10 ml de la solución (a) con 800 ml de agua de dilución, se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 l con agua de dilución.

Este método utiliza tan solo 0,5 ml de efluente/l como inoculo y, por tanto, puede ser necesario enriquecer el medio con oligoelementos y factores de crecimiento. Esto se consigue añadiendo 1 ml de cada una de las siguientes soluciones por litro de medio final:

▼B

Solución de oligoelementos:

| | |
|---|---|
| Sulfato de manganeso tetrahidratado, $MnSO_4 . 4H_2$ | 39,9 mg |
| Acido bórico, $H_3BO_3$ | 57,2 mg |
| Sulfato de zinc heptahidratado, $ZnSO_4 . 7H_2$ | 42,8 mg |
| Heptamolibdato de amonio $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$ | 34,7 mg |
| Quelato de hierro ($FeCl_3$ ácido etilendiamínotetraacético) | 100,0 mg |

Disolver en agua de dilución y llevar a 1 000 ml.

Solución de vitaminas:

| | |
|---|---|
| Extracto de levadura | 15,0 mg |

Disolver el extracto de levadura en 100 ml de agua. Esterilizar mediante filtración por membrana de 0,2 micrómetros o bien preparar extemporáneamente.

III.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo está derivado de un efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba de manera primordial aguas residuales domésticas. Véanse los puntos I.6.4.2. y I.6.5.

Se usan 0,5 ml por litro de medio mineral.

III.2.4. **Preparación de los matraces**

Se introducen porciones de, por ejemplo, 800 ml de medio minera] en matraces cónicos de 2 litros y se añaden volúmenes suficientes de las soluciones madre de las sustancias problema y de referencia a los distintos matraces para obtener una concentración de sustancia equivalente a 10-40 rng COD/l. Revise el valor pH y ajústelo si es necesario, a 7,4. Se inoculan los matraces con efluente de aguas residuales en la proporción de 0,5 ml/l (véase el punto I.6.4.2). También deben prepararse controles del inóculo con el medio mineral pero sin sustancia problema ni de referencia.

En caso necesario, puede utilizarse un matraz para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema inoculando una solución que contenga, en medio mineral, concentraciones comparables tanto de la sustancia problema como de una sustancia de referencia.

También, en caso necesario, puede prepararse otro matraz estéril para comprobar si la sustancia problema se degrada abioticamente utilizando una solución de esta sustancia sin inóculo (véase el punto I.6.6).

Además, si se sospecha que la sustancia problema puede adsorberse de forma significativa en el recipiente utilizado para el ensayo, en los lodos, etc., debe hacerse una prueba previa para determinar el alcance probable de la absorción y, en consecuencia, la adecuación de la prueba para esa sustancia concreta (véase el cuadro 1). Prepárese un matraz conteniendo la sustancia problema, el inóculo y un agente esterilizante.

Todos los matraces se enrasan a 1 1 con medio mineral y, después de agitar, se toma una muestra de cada matraz para determinar la concentración inicial de COD (véase el anexo II.4). Se tapan las bocas de los matraces con papel de aluminio, por ejemplo, de forma que se permita la libre circulación de aire entre el matraz y la atmósfera circundante. A continuación se ponen los recipientes en el agitador para iniciar el ensayo.

▼B

III.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

Matraces 3 y 4: con inoculo solo (blanco con inóculo)

Matraz 5: control de procedimiento

Preferentemente y cuando sea necesario:

Matraz 6: control estéril abiótico

Matraz 7: control de adsorción

Matraz 8: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

III.2.6. **Realización del ensayo**

A lo largo del ensayo hay que determinar las concentraciones de COD en cada matraz por duplicado a intervalos de tiempo conocidos, con la suficiente frecuencia como para poder determinar el inicio del período de observación de 10 días y el porcentaje de eliminación al final de dicho período de 10 días. Para cada determinación debe tomarse solo el volumen mínimo necesario de suspensión problema.

Antes de tomar las muestras, hay que compensar las pérdidas que se han producido por evaporación del medio de ensayo en los matraces, añadiendo la cantidad necesaria de agua de dilución (I.6.1). Antes de tomar las muestras hay que agitar bien el medio de cultivo y asegurarse de que el material que se hubiera adherido a las paredes de los recipientes se disuelve o se resuspende. Se filtra por membrana o se centrifuga (véase el anexo II.4) inmediatamente después de haber tomado la muestra. Las muestras filtradas o centrifugadas se analizan el mismo día; en caso contrario, se conservan a 2-4 $^{o}$C durante 48 horas como máximo o por debajo de - 18 $^{o}$C durante un período más prolongado

III.3. DATOS E INFORME

III.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se calcula el porcentaje de degradación en el tiempo t según se indica en I.7.1 (determinación de COD) y, de forma optativa, en I.7.2 (análisis específico).

Todos los resultados deben registrarse en las fichas de recogida de datos indicadas.

III.3.2. Validez de los resultados

Véase el punto I.5.2.

III.3.3. Informe

Véase el punto I.8.

III.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se ofrece un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE DETECCIÓN DE LA OECD MODIFICADO

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

▼B

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:

Concentración de la solución madre: … mg/l en sustancia química

Concentración inicial en el medio, $t_0$: … mg/l en sustancia química

4. **INÓCULO**

Fuente:

Tratamiento realizado:

Acondicionamiento previo en su caso:

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: mg/l

5. **DETERMINACIONES DE CARBONO**

Analizador de carbono:

| | Matraz nº | | COD tras n días (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Substancia problema más inóculo | 1 | $a_1$ | | | | | |
| | | $a_2$ | | | | | |
| | | a, media $C_{a(t)}$ | | | | | |
| | 2 | $b_2$ | | | | | |
| | | $b_2$ | | | | | |
| | | b, media $C_{b(t)}$ | | | | | |
| Blanco con inóculo pero sin substancia problema | 3 | $c_2$ | | | | | |
| | | $c_2$ | | | | | |
| | | c, media $C_{b(t)}$ | | | | | |
| | 4 | $d_2$ | | | | | |
| | | $d_2$ | | | | | |
| | | d, media $C_{b(t)}$ | | | | | |
| | $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |

6. **EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS**

| Matraz | | % de degradación trasndías | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_4$ |
| 1 | $D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |

▼B

| Matraz | | % de degradación trasndías | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_4$ |
| 2 | $D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$ | 0 | | | | |
| media (*) | $D = \frac{D_1 - D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) Si existe una diferencia considerable entre $D_1$ y $D_2$, no debe calcularse el término medio.

*Nota:* Pueden utilizarse fórmulas similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad.

7. **CONTROL ABIÓTICO** (optativo)

| | Tiempo (dias) | |
|---|---|---|
| | 0 | t |
| conc. de COD (mg/l) en el control estéril | $C_{s(o)}$ | $C_{s(t)}$ |

$$\% \text{ dedegradación abiótica} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. **ANALISIS QUÍMICO ESPECÍFICO** (optativo)

| | Cantidad residual de la substancia química al final de la prueba | % degradacíib primaria |
|---|---|---|
| Control estéril | $S_b$ | |
| Prueba con el medio inoculado | $S^a$ | $\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$ |

PARTE IV. ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO DE $CO_2$ (Método C.4-C)

IV.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se hace pasar una corriente de aire exento de dióxido de carbono a velocidad controlada, en la oscuridad o bajo luz difusa, a través de un volumen medido de medio mineral inoculado que contiene una concentración conocida de la sustancia problema (10-20 mg COD o COT/l) como única fuente nominal de carbono orgánico. La degradación se observa a lo largo de 28 días determinando el dióxido de carbono producido, que se recoge en hidróxido de sodio o de bario y se mide por valoración del hidróxido residual o como carbono inorgánico. La cantidad de dióxido de carbono producido a partir de la sustancia problema (con las correcciones necesarias según el resultado del blanco con inóculo) se expresa como porcentaje de $CO_2$T. El grado de biodegradación también puede calcularse mediante un análisis complementario de COD realizado al principio y al final de la incubación.

▼B

IV.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

IV.2.1. **Equipo**

a) Matraces, 2-5 litros, provisto cada uno de un tubo de aireación, que llegue practicamente al fondo del recipiente, y de una salida.

b) Agitadores magnéticos, cuando se trate de sustancias poco solubles.

c) Frascos de absorción de gases.

d) Aparato para controlar y medir el flujo de aire.

e) Aparato para eliminar el dióxido de carbono en la preparación de aire exento de dióxido de carbono; otra posibilidad es utilizar una mezcla de oxigeno exento de $CO_2$ y de nitrógeno exento de $CO_2$, provenientes de sendas botellas, en las proporciones correctas (20 % $O_2$:80 % $N_2$).

f) Equipo para determinar el dióxido de carbono, bien volumétricamente o bien con un analizador de carbono inorgánico.

g) Equipo de filtración por membrana (opcional).

h) Analizador de COD (opcional).

IV.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de las soluciones madre, véase el puanto I.6.2.

Se mezclan 10 ml de solución (a) con 800 ml de agua de dilución; se añade 1 ml de las soluciones (b) a (d) y se enrasa a 1 l con agua de dilución.

IV.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 y I.6.5.

IV.2.4. **Preparación de los matraces**

Los siguientes volúmenes y pesos, dados meramente como ejemplo, indican los valores apropiados para matraces de 5 litros que contengan 3 l de suspensión. Si se utilizan volúmenes más pequeños hay que modificar los valores en consecuencia, pero hay que asegurarse de que el dióxido de carbono formado puede medirse con precisión.

A cada matraz de 5 litros se añaden 2 400 ml de medio mineral. Se añade a continuación un volumen adecuado del lodo activado ya preparado (véanse los puntos I.6.4.1 y I.6.5) para tener una concentración de sólidos en suspensión que no exceda de 30 mg/l en el volumen final de 3 l de mezcla inoculada. Otra posibilidad es diluir en primer lugar el lodo preparado para obtener una suspensión de 500-1 000 mg/l en el medio mineral antes de añadir una alícuota al contenido del matraz de 5 litros para obtener una concentración final de 30 mg/l; de esta forma se consigue mayor precisión. También pueden utilizarse otras fuentes de inóculos (véase el punto I.6.4.2). Añadir una alícuota al contenido del matraz de 5 litros para obtener una concentración final de 30 mg/l; de esta forma se consigue mayor precisión. También pueden utilizarse otras fuentes de inóculos (véase el punto I.6.4.2).

Estas mezclas inoculadas se someten a un flujo de aire exento de $CO_2$ durante una noche para purgar el dióxido de carbono del sistema.

▼B

Se añade a los matraces, por separado y por duplicado, la sustancia problema y la sustancia de referencia procedentes de sendas soluciones madre, en volúmenes conocidos, como para obtener concentraciones de 10 a 20 mg de COD o COT/l, procedente de las sustancias añadidas; algunos matraces se dejan como controles del inóculo sin añadirles ninguna sustancia. Las sustancias problema poco solubles se añaden directamente, a los matraces teniendo en cuenta una relación de peso o de volumen, o bien se opera según se describe en el anexo III.

En caso necesario, puede utilizarse un matraz para comprobar el posible efecto inhibidor de la sustancia problema añadiendo tanto sustancia problema como sustancia de referencia en las mismas concentraciones que se dan en los otros matraces.

También, en caso necesario, puede utilizarse un matraz estéril para comprobar si la sustancia problema se degrada abioticamente utilizando una solución de la sustancia sin inóculo (véase I.6.6.). Esterilícese mediante la adición de una sustancia tóxica en la concentración apropiada.

Se llevan los volúmenes de las suspensiones de todos los matraces a 3 l mediante adición de medio mineral previamente aireado con aire exento de $CO_2$. Otra posibilidad es tomar muestras para el análisis del COD (véase el anexo II.4.) o análisis específicos. Se conectan los frascos de absorción a las salidas de aire de los matraces.

Si se utiliza hidróxido de bario, hay que conectar a cada matraz de 5 litros tres frascos de absorción puestos en serie, cada uno con 100 ml de solución de hidróxido de bario 0,0125 M. La solución debe estar exenta de sulfatos y carbonatos precipitados y su concentración debe determinarse justo antes de ser utilizada. Si se utiliza hidróxido de sodio, se conectan dos frascos, de los que el segundo actúa como control para comprobar que todo el dióxido de carbono ha quedado absorbido en el primero. Son adecuados los frascos de absorción provistos de cierres de botellas de suero. A cada frasco se añaden 200 ml de solución de hidróxido de sodio 0,05 M, cantidad suficiente para absorber todo el dióxido de carbono producido si la sustancia química se degrada por completo. La solución de hidróxido de sodio, incluso cuando se prepara extemporáneamente, contiene trazas de carbonatos; esto se corrige deduciendo la cantidad de carbonatos presentes en el blanco.

IV.2.5. **Número de matraces en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

Matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

Matraz 5: control de procedimiento

Preferentemente y cuando sea necesario:

Matraz 6: control estéril abiótico

Matraz 7: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

IV.2.6. **Realización del ensayo**

El ensayo se inicia haciendo borbotear aire exento de $CO_2$ a través de las suspensiones a la velocidad de 30-100 ml/min. Periódicamente se toman muestras del absorbente de dióxido de carbono para analizar el contenido de $CO_2$. Durante los primeros 10 días se recomienda que los análisis se hagan cada dos o tres días y, después, cada cinco días hasta llegar al día 28, de forma que pueda determinarse el período de observación de 10 días.

▼B

El día 28 se toman muestras (opcionalmente) para el análisis de COD o análisis específicos, se mide el pH de las suspensiones y se añade 1 ml de ácido clorhídrico concentrado a cada matraz; se airean los frascos durante una noche para arrastrar el dióxido de carbono presente en las suspensiones problema. El día 29 se hace el último análisis del dióxido de carbono producido.

Los días en que se haga la medición del $CO_2$, se desconecta el absorbente de hidróxido de bario más próximo al matraz y se valora la solución de hidróxido con HC1 0,05 M utilizando fenolftaleína como indicador. Los restantes absorbentes se unen al matraz y se coloca en el extremo libre de la serie un nuevo absorbente con 100 ml de hidróxido de bario 0,0125 M recién preparado. Hay que hacer valoraciones según sea necesario, por ejemplo, cuando se observe la aparición de un precipitado importante en el primer frasco y antes de que aparezca en el segundo, o al menos una vez por semana. Cuando se utiliza NaOH como absorbente, se toma con jeringa una muestra pequeña (según las características del analizador de carbono utilizado) de la solución de hidróxido de sodio del absorbente más próximo al matraz. Se inyecta la muestra en la parte CI del analizador de carbono para analizar directamente el dióxido de carbono producido.

El contenido del segundo frasco solo se analiza al final de la prueba para introducir las correcciones necesarias en caso de que se haya producido arrastre de dióxido de carbono.

IV.3. DATOS E INFORME

IV.3.1. **Tratamiento de los resultados**

La cantidad de $CO_2$ retenida en un absorbente viene dada por:

$$mgCO2 = (100 \times C_B\text{-}0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

donde:

V = volumen de HC1 utilizado para valorar los 100 ml del absorbente (ml)

$C_B$ = concentración de la solución de hidróxido de bario (M)

$C_A$ = concentración de la solución de ácido clorhídrico (M).

Si $C_B$ es 0,0125 M y $C_A$ es 0,05 M, el resultado de la valoración de 100 ml de hidróxido de bario es 50 ml y el peso de $CO_2$ viene dado por:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCI valorado} = 1{,}1 \times \text{ml HCI}$$

Así pues, para pasar el volumen de HC1 valorado a mg de $CO_2$ producido, el factor en este caso es 1,1.

Se calculan los pesos de $CO_2$ producido del inóculo solo y del inóculo más la sustancia problema utilizando los respectivos resultados de valoración y la diferencia es el peso de $CO_2$ producido a partir de la sustancia problema sola.

Por ejemplo, si el inóculo solo da una valoración de 48 ml y el inóculo con la sustancia problema da 45 ml,

$CO_2$ del inóculo = 1,1 × (50-48) = 2,2 mg

▼B

$CO_2$ del inóculo con la sustancia problema = 1,1 × (50-45) = 5,5 mg

y, por tanto, el peso de $CO_2$ producido a partir de la sustancia problema es 3,3 mg.

El porcentaje de biodegradación se calcula con la fórmula siguiente:

$$\%\text{degradación} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ producido} \times 100}{CO_2T \times \text{mg de substancia problema añadida}}$$

o bien

$$\%\text{degradación} = \frac{\text{mg } CO_2 \text{ producido} \times 100}{\text{mg COT añadido en la prueba} \times 3{,}67}$$

3,67 es el factor de conversión (44/12) para pasar de carbono a dióxido de carbono.

El porcentaje de degradación tras un intervalo cualquiera de tiempo se obtiene sumando los valores porcentuales de $CO_2T$ calculados para cada uno de los días hasta el momento en que se haya medido.

En el caso de absorbentes de hidróxido de sodio, la cantidad de dióxido de carbono producido, expresado como CI (mg) se calcula multiplicando la concentración de CI en el absorbente por el volumen de este.

. El porcentaje de degradación se calcula con la fórmula siguiente:

$$\%\ CO_2T = \frac{\text{mg CI del matraz problema} - \text{mg CI del blanco}}{\text{MG COT añadido como substancia problema}} \times 100$$

La pérdida de COD se calcula opcionalmente según se describe en 1.7. Se registran estos resultados y todos los demás en las fichas de datos mencionadas.

IV.3.2. **Validez de los resultados**

El contenido en CI de la suspensión de sustancia problema en el medio mineral al inicio de la prueba debe ser inferior al 5 % del CT, y el desprendimiento total de $CO_2$ en el blanco con inóculo al final de la prueba no debe exceder normalmente de 40 mg/l por término medio. Si se obtienen valores superiores a 70 mg $CO_2$/l, es necesario revisar críticamente los datos y la técnica experimental.

Véase también el punto I.5.2.

IV.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

IV.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se presenta un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DE DESPRENDIMIENTO DE DIÓXIDO DE CARBONO

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:…

Concentración de la solución madre: … mg/l en sustancia química

▼B

Concentración inicial en el medio: … mg/l en sustancia química

Carbono total añadido al matraz: … mg C

$CO_2T$: … mg $CO_2$

4. **INOCULO**

Fuente: …

Tratamiento realizado: …

Acondicionamiento previo en su caso: …

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: … mg/l

| Tiemp (día) | $CO_2$ formado (mg) | | $CO_2$ formado blanco (mg) | | $C0_2$ formado acumulado (mg) (ensayo menos blanco) | | % $CO_2$ $\frac{CO_2 acumulado}{CO_2T} \times 100$ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 / 2 | media | 3 / 4 | media | 1 | 2 | 1 | 2 | media |
| 0 | | | | | | | | | |
| $n_1$ | | | | | | | | | |
| $n_2$ | | | | | | | | | |
| $n_3$ | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | |
| 28 | | | | | | | | | |

*Nota:* Pueden utilizarse otros formatos similares para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad

5. **PRODUCCION DE DIOXIDO DE CARBONO Y DEGRADABILIDAD:**

Método: $Ba(OH)_2$/NaOH/otro

6. **ANALISIS DE CARBONO** (opcional)

Analizador de carbono:

| Tiempo (día) | blanco mg/l | sustancia problema mg/l |
|---|---|---|
| 0 | $C_{b(o)}$ | $C_0$ |
| 28 (*) | $C_{b(t)}$ | $C_t$ |

(*) O al final de la incubación.

▼B

$$\% \text{ COD eliminado} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **DEGRADACIÓN ABIÓTICA** (opcional)

$$\%\text{degrad. abiót.} = \frac{\text{formac. de } CO_2 \text{ en el matraz estéril tras 28 días (mg)}}{CO_2\text{T (mg)}} \times 100$$

PARTE V. **RESPIROMETRÍA MANOMÉTRICA** (Método C.4-D)

V.I. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se somete a agitación en un frasco cerrado a temperatura constante (± 1 °C o más exacto), durante 28 días, un volumen medido de medio mineral inoculado que contenga una concentración conocida de la sustancia química de ensayo (100 mg/l de la sustancia de ensayo, para dar al menos 50-100 mg DTO/l) como única fuente nominal de carbono orgánico. Se determina el consumo de oxígeno midiendo la cantidad de oxígeno (producido por electrólisis) requerido para mantener un volumen constante de gas en el frasco del respirómetro, o a partir de los cambios de volumen o presión (o una combinación de ambas cosas) en el aparato. El dióxido de carbono producido se absorbe en una solución de hidróxido potásico u otro absorbente adecuado. La cantidad de oxígeno consumido por la sustancia problema (corregida según el consumo del blanco con inóculo, realizada en paralelo) se expresa como porcentaje de DTO o DQO. Opcionalmente, se puede calcular también la biodegradación primaria mediante un análisis adicional específico realizado al comienzo y al final de la incubación, y la biodegradación última mediante un análisis de COD.

V.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

V.2.1. **Equipo**

a) Respirómetro adecuado.

b) Control de temperatura, manteniéndolo con un margen de ± 1 °C o más exacto.

c) Conjunto de membrana y filtros (opcional).

d) Analizador de carbono (opcional).

V.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de las soluciones madre, véase I.6.2.

Mezclar 10 ml de la solución (a) con 800 ml de agua de dilución, añadir 1 ml de las soluciones (b) a (d) y enrasar hasta 1 l con agua de dilución.

V.2.3. **Preparación y acondicionamiento previo del inóculo**

El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, aguas residuales efluentes, aguas superficiales, suelos, o de una combinación de ellos.

Véanse los puntos I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 y I.6.5.

V.2.4. **Preparación de los frascos**

Preparar soluciones de las sustancias problema y de referencia, en lotes separados, en un medio mineral equivalente a una concentración, normalmente, de 100 mg de sustancia/l (que dé al menos 50-100 mg DTO/l) utilizando soluciones madre.

▼B

Calcular la DTO sobre la base de la formación de sales de amonio salvo que se prevea nitrificación; en este caso, el cálculo debe basarse en la formación de nitratos (véase el anexo II.2).

Determinar los valores de pH y, si es necesario, ajustarlos a 7,4 ± 0,2.

Las sustancias débilmente solubles deben añadirse en un estadio posterior (véase más abajo).

Si hay que determinar la toxicidad de la sustancia problema, preparar posteriormente otra solución en medio mineral que contenga tanto la sustancia problema como la de referencia a las mismas concentraciones que las utilizadas para el ensayo.

Si se necesita una medida del consumo fisicoquímico de oxígeno, preparar una solución de la sustancia problema, generalmente, a una concentración de 100 mg DTO/1. Esterilizar dicha solución mediante la adición de una sustancia tóxica adecuada (véase el punto I.6.6).

Introducir en frascos, al menos por duplicado, el volumen necesario de soluciones de sustancias problema y de referencia. Añadir a los siguientes frascos solamente medio mineral (para controles de inóculos) y, si es necesario, la solución con mezcla de sustancia problema y de referencia y la solución estéril.

Si la sustancia problema es poco soluble, se añadirá directamente en este estadio basándose en el volumen o en el peso o actuando como se describe en el anexo III. Añadir hidróxido de potasio con cal sodada u otro absorbente a los compartimentos de absorción de $CO_2$.

V.2.5. **Número de frascos en un ensayo normal**

Matraces 1 y 2: suspensión de ensayo

Matraces 3 y 4: con inóculo solo (blanco con inóculo)

Matraz 5: control de procedimiento

Preferentemente y cuando sea necesario:

Matraz 6: control estéril

Matraz 7: control de toxicidad.

Véase también el punto I.6.7.

V.2.6. **Realización del ensayo**

Se deja que los recipientes alcancen la temperatura deseada y se inoculan los recipientes adecuados con lodo activado preparado u otra fuente de inóculo para obtener una concentración de sólidos suspendidos no superior a 30 mg/l. Se monta el equipo, se pone en marcha el agitador y se controla la impermeabilidad al aire, comenzando en este momento la medición del consumo de oxígeno. Generalmente no hay que hacer más que tomar las lecturas necesarias y los controles diarios para asegurarse de que se mantienen la temperatura correcta y la agitación adecuada.

Calcular el consumo de oxígeno según las lecturas tomadas a intervalos frecuentes y regulares, utilizando los métodos proporcionados por el fabricante del equipo. Ai final de la incubación, normalmente 28 días, medir el pH del contenido de los frascos, especialmente si el consumo de oxígeno es inferior o superior a la $DTO_{NH4}$ (en aquellos compuestos que contengan nitrógeno).

▼B

Si es necesario, se tomarán muestras de los frascos del respirómetro, al comienzo y al final, para analizar el COD o realizar un análisis químico específico (véase el anexo II.4). Cuando se haga la primera toma de muestras, hay que asegurarse de que se conoce el volumen de suspensión problema que queda en el frasco. Cuando la sustancia problema nitrogenada consuma oxígeno, determinar el aumento de la concentración de nitrito y nitrato en 28 días y calcular la corrección teniendo en cuenta el oxígeno consumido por nitrificación (véase el anexo V).

V.3. DATOS E INFORME

V.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Dividir el consumo de oxígeno (mg) de la sustancia problema después de un tiempo dado (corregido según el blanco con inóculo después del mismo tiempo) entre el peso de la sustancia problema utilizada. Esto dará la DBO expresada en mg de oxígeno/mg de sustancia problema, es decir

$$\text{DBO} = \frac{(\text{mg } O_2 \text{ consumido por la sust. problema} - O_2 \text{ consumido por el blanco})}{(\text{mg de substancia problema en el frasco})}$$

= mg de $O_2$ por mg de substancia problema

calcular el porcentaje de biodegradación, bien a partir de:

$$\%\text{ de biodegradación} = \%\text{ DOT} = \frac{\text{DBO}(\text{mg } O_2/\text{mg substancia})}{\text{DOT}(\text{mg } O_2/\text{mg substancia})} \times 100,$$

o bien de:

$$\%\text{ DQO} = \frac{\text{DBO}(\text{mg } O_2/\text{mg substancia})}{\text{DQO}(\text{mg } O_2/\text{mg substancia})} \times 100$$

Debe señalarse que estos dos métodos no dan necesariamente el mismo valor. Es preferible usar el primero.

En el caso de sustancias a examinar que contengan nitrógeno, se utiliza la DTO ($NH_4$ o $NO_3$) adecuada según se espere o se sepa que va haber nitrificación o no (véase el anexo II.2). Si hay nitrificación pero no es completa, se calcula una corrección según el oxígeno consumido por nitrificación basándose en los cambios de la concentración de nitrito y nitrato (véase el anexo V).

Cuando se hagan determinaciones opcionales de carbono orgánico o análisis químicos específicos, calcular la degradación porcentual, tal como se describe en el punto I.7.

Registrar todos los resultados en las fichas de datos adjuntas.

V.3.2. **Validez de los resultados**

El consumo de oxígeno del blanco con inóculo es normalmente de 20-30 mg $O_2$/l y no debe ser superior a 60 mg/l en 28 días. Los valores superiores a 60 mg/l exigirán un examen crítico de los datos y de las técnicas experimentales. Si el valor del pH está fuera del rango 6-8,5 y el consumo de oxígeno por la sustancia problema es inferior al 60 %, debe repetirse el ensayo con menor concentración de la sustancia problema.

Véase también el punto I.5.2.

▼B

V.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

V.4. **FICHA DE RECOGIDA DE DATOS**

A continuación se da un ejemplo de una ficha de recogida de datos.

RESPIROMETRÍA MANOMÉTRICA

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre: …

Concentración de la solución madre: … mg/l

Concentración inicial en el medio, $C_o$: … mg/l

Volumen en el matraz de prueba (V): … ml

DTO de sustancia/DQO de sustancia: … mg $O_2$/mg de sustancia a examinar ($NH_4$, $NO_3$)

4. **INÓCULO**

Fuente: …

Tratamiento realizado: …

Acondicionamiento previo en su caso: …

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: … mg/l

5. **CONSUMO DE OXÍGENO: BIODEGRADABILIDAD**

| | | Tiempo (dias) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | | 7 | | 14 | | | 21 | | | 28 | |
| $O_2$ consumido (mg) sust. problema | 1 | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | |
| | a, media | | | | | | | | | | | | |
| $O_2$ consumido (mg) blanco | 3 | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | |
| | b, media | | | | | | | | | | | | |
| DBO (mg) corregida | $(a_1 — b_m)$ | | | | | | | | | | | | |
| | $(a_2 — b_m)$ | | | | | | | | | | | | |
| DBO por mg de sustancia problema | $\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$ | | | | | | | | | | | | |
| | $\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$ | | | | | | | | | | | | |

▼B

| | | Tiempo (dias) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | | 7 | | 14 | | | 21 | | | 28 | |
| % degradación | $D_1$ ($a_1$) | | | | | | | | | | | | |
| $\frac{DBO}{DOT} \times 100$ | $D_2$ ($a_2$) | | | | | | | | | | | | |
| | Media (*) | | | | | | | | | | | | |

V = volumen de medio en los frascos del ensayo.
(*) Si existe una diferencia considerable entre $D_1$ y $D_2$, no debe calcularse el término medio.

*Nota:* Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. **CORRECCIÓN POR NITRIFICACIÓN** (véase el anexo V)

| Día | | 0 | 28 | Diferencia |
|---|---|---|---|---|
| (i) | Concentración de nitrato (mg N/l) | | | (N) |
| (ii) | Equivalente de oxígeno (4,57 × N × V) (mg) | — | | |
| (iii) | Concentración de nitrito (mg N/l) | | | (N) |
| (iv) | Equivalente de oxígeno (3,43 × N × V) (mg) | — | — | |
| (ii + iv) | Equivalente total de oxígeno | — | — | |

7. **ANÁLISIS DE CARBONO** (opcional)

Analizador de carbono:

| Tiempo (da) | Blanco mg/l | Sustancia problema mg/l |
|---|---|---|
| 0 | ($C_{blo}$) | ($C_o$) |
| 28 (*) | ($C_{blt}$) | ($C_t$) |

(*) O al final de la incubación.

$$\% \text{ COD eliminado} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO** (opcional)

$S_b$ = concentración en el control fisicoquímico (estéril) a los 28 días.

$S_a$ = concentración en el frasco inoculado a los 28 días.

$$\% \text{ biodegradación} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **DEGRADACIÓN ABIÓTICA** (opcional)

a = consumo de oxígeno en frascos estériles después de 28 días, mg.

$$\text{consumo de oxígeno por rag de sustancia problema} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(véanse las secciones 1 y 3)

$$\%\text{degradación abiótica} = \frac{a \times 100}{C_o V \times DTO}$$

PARTE VI. **ENSAYO DEL FRASCO CERRADO** (Método C.4-E)

VI. 1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se prepara una solución de la sustancia problema en medio mineral, generalmente con una concentración de 2-5 mg/l. Esta solución se inocula con un número relativamente pequeño de microorganismos de una población mixta y se mantiene en frascos cerrados completamente llenos, en la oscuridad y a temperatura constante. La degradación se sigue mediante el análisis del oxígeno disuelto durante un período de 28 días. La cantidad de oxígeno consumido por la sustancia problema, corregido según el consumo de oxígeno por parte del blanco con inóculo realizado en paralelo, se expresa como porcentaje de DTO o DQO.

VI.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

VI.2.1. **Equipo**

a) Frascos de DBO, con tapones de cristal de, por ejemplo, 250-300 ml.

b) Baño maría o incubadora, para mantener los frascos a temperatura constante (± 1 °C o más exacto) en la oscuridad.

c) Frascos de cristal grandes (2-5 1) para la preparación de medios y para rellenar los frascos de DBO.

d) Electrodo de oxígeno y oxímetro o equipamiento y reactivos para la valoración según Winkler,

VI.2.2. **Preparación del medio mineral**

Para la preparación de la solución madre, véase el punto I.6.2.

Mezclar 1 ml de las soluciones (a) a (d) y rellenar hasta 1 l con agua de dilución.

VI.2.3. **Preparación del inóculo**

El inóculo se deriva normalmente de un efluente secundario de una planta depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Otra fuente posible de inóculo es el agua superficial. Utilizar normalmente desde una gota (0,05 ml) hasta 5 ml de filtrado por litro de medio; se pueden necesitar varias pruebas para descubrir el volumen óptimo para un efluente dado. (Véanse los puntos I.6.4.2 y I.6.5)

VI.2.4. **Preparación de los frascos**

Se airea intensamente el medio mineral durante 20 minutos por lo menos. Realizar cada serie de ensayos con el mismo medio mineral. Generalmente, el medio está listo para su uso después de dejarlo reposar 20 horas, a la temperatura del ensayo. Determinar la concentración de oxígeno disuelto como control; debe dar un valor de unos 9 mg/l a 20 °C. Todas las operaciones de transferencia y llenado de medio saturado de aire y sin burbujas, se harán, por ejemplo, mediante sifones.

▼B

Se preparan grupos paralelos de frascos de DBO para la determinación de sustancias problema y de referencia en series experimentales simultáneas. Reunir un número suficiente de frascos de DBO, incluyendo blancos con inóculo, para permitir hacer, al menos por duplicado, mediciones de consumo de oxígeno a los intervalos deseados, por ejemplo, a los 0, 7, 14, 21 y 28 días. Pueden ser necesarios más frascos si se quiere determinar el período de observación de 10 días.

Se añade medio mineral bien aireado a frascos grandes de manera que estén llenos aproximadamente hasta un tercio de su capacidad. A continuación se añade suficiente cantidad de las soluciones madre de las sustancias problema y de las sustancias de referencia a frascos grandes por separado de forma que la concentración final de las sustancias químicas no exceda normalmente de 10 mg/l. No se añadirá ninguna sustancia al blanco de control contenido en otro frasco grande.

La concentración de oxígeno disuelto no debe bajar por debajo de 0,5 mg/l en los frascos de DBO, para poder garantizar la no limitación de la actividad del inóculo. Esto limita la concentración de la sustancia problema a unos 2 mg/l. Sin embargo, en caso de compuestos poco degradables y de aquéllos que tienen baja DTO, puede usarse una concentración de 5-10 mg/l. En algunos casos, es aconsejable realizar series paralelas de sustancias problema a dos concentraciones diferentes, por ejemplo, 2 y 5 mg/l. Normalmente, se calculará la DTO basándose en la formación de sales de amonio pero, si se espera o se sabe que va a haber nitrificación, se calculará basándose en la formación de nitrato ($DTO_{NO3}$: véase el anexo II.2). No obstante, si hay nitrificación pero no es completa, se corregirá de acuerdo con los cambios en la concentración de nitrito y nitrato, determinada por análisis (véase el anexo V).

Si se va a investigar la toxicidad de la sustancia problema (en el caso, por ejemplo, de que se haya encontrado previamente un valor de biodegradabilidad bajo), será necesaria otra serie de frascos.

Se prepara otro frasco grande que contenga medio mineral aireado (alrededor de un tercio de su volumen) más la sustancia problema y la de referencia a concentraciones finales normalmente iguales a las de los otros frascos grandes.

Se inoculan las soluciones en los frascos grandes con efluente secundario (desde una gota, alrededor de 0,05 ml, hasta 5 ml/l) o con otra fuente como agua de río (véase el punto I.6.4.2). Finalmente se llevan las soluciones al volumen deseado con medio mineral aireado utilizando un tubo que llegue hasta el fondo del frasco para conseguir una mezcla adecuada.

VI.2.5. **Número de frascos en una serie típica**

En una serie típica se usan los siguientes frascos:

— al menos 10 que contengan la sustancia problema y el inóculo (suspensión de ensayo),

— al menos 10 que solo contengan el inóculo (blanco con inóculo),

— al menos 10 que contengan la sustancia de referencia y el inóculo (control de procedimiento),

▼B

— y, cuando sea necesario, 6 frascos que contengan la sustancia problema, la sustancia de referencia y el inóculo (control de toxicidad). Sin embargo, puede necesitarse al menos el doble de frascos si se desea garantizar la posibilidad de determinar el período de observación de 10 días.

VI.2.6. Realización del ensayo

Se introduce inmediatamente cada solución preparada en el respectivo grupo de frascos de DBO mediante un tubo desde el cuarto inferior (no el fondo) del frasco grande apropiado, de forma que se rellenen completamente todos los frascos de DBO. Se golpea ligeramente para eliminar toda burbuja de aire. Se analizan inmediatamente los frascos para determinar el oxigeno disuelto a tiempo cero, mediante los métodos de Winkler o de electrodo. Pueden preservarse los contenidos de los frascos, para su análisis ulterior, mediante el método de Winkler añadiendo sulfato de manganeso (II) e hidróxido sódico (el primer reactivo del método Winkler); estos frascos, que contienen el oxígeno fijado como óxido hidratado de manganeso (III) (precipitado marrón), se pueden almacenar en la oscuridad y a 10-20 $^{o}$C durante no más de 24 horas antes de continuar con el análisis según el método de Winkler. Se tapan los restantes frascos replicados asegurándose de que no quedan burbujas dentro de ellos y se incuban a 20 $^{o}$C en la oscuridad. Cada serie debe acompañarse de una serie paralela completa para la determinación en el blanco inoculado. Retirar al menos frascos duplicados de todas las series para el análisis del oxígeno disuelto a intervalos de tiempo (al menos semanalmente) durante los 28 días de incubación.

Las muestras semanales permitirán la valoración del porcentaje de eliminación en un período de observación de 14 días, mientras que las muestras tomadas cada 3 o 4 días permitirán determinar el período de observación de 10 días, lo que requerirá aproximadamente el doble de frascos.

En el caso de las sustancias que contengan nitrógeno, deberán hacerse correcciones del consumo de oxígeno si tiene lugar cualquier tipo de nitrificación. Con este fin, se usará el método del electrodo de $O_2$ a fin de determinar la concentración de oxígeno disuelto y sacar una muestra del frasco de DBO para análisis de nitrito y nitrato. El oxígeno utilizado se calculará a partir del aumento de concentración de nitrito y nitrato (véase el anexo V).

VI.3. DATOS E INFORME

VI.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se calcula en primer lugar la DBO obtenida tras cada período de tiempo sustrayendo la depleción de oxígeno (mg $O_2$/l) del blanco con inóculo de la que presenta la sustancia problema. Se divide esta depleción corregida entre la concentración (mg/l) de la sustancia problema a fin de obtener la DBO específica en mg de oxígeno por mg de sustancia problema, Se calcula la biodegradabilidad porcentual dividiendo la DBO específica entre la DTO específica (calculada de acuerdo con el anexo II.2) o la DQO (determinada por análisis, véase el anexo II.3); así pues:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg de consumo } O_2 \text{ de sustancia problema} - \text{mg } O_2 \text{ consumo blanco}}{\text{mg sustancia problema en el frasco}}$$

▼B

= mg de $O_2$ por mg de sustancia problema

$$\% \text{ degradación} = \frac{\text{DBO (mg } O_2/\text{mg sustancia problema)}}{\text{DTO(mg } O_2/\text{mg sustancia problema)}} \times 100$$

o

$$\% \text{ degradación} = \frac{\text{BOD (mg } O_2/\text{mg sustancia problema)}}{\text{DQO(mg } O_2/\text{mg sustancia problema)}} \times 100$$

En el caso de sustancias que contengan nitrógeno, se utiliza la DTO ($NH_4$ o $NO_3$) adecuada según se espere o se sepa que va haber nitrificación o no (véase el anexo II.2), Si hay nitrificación pero no es completa, se calcula una corrección según el oxígeno consumido por nitrificación basándose en los cambios de la concentración de nitrito y nitrato (véase el anexo V).

VI.3.2. **Validez de los resultados**

La depleción de oxígeno en el blanco con inóculo no debe sobrepasar 1,5 mg de oxígeno disuelto/l después de 28 días. Si hay valores superiores a este, deberá hacerse una revisión de las técnicas experimentales. La concentración residual de oxígeno en los frascos del ensayo no deberá bajar por debajo de 0,5 mg/l en ningún momento. Estos valores tan bajos de oxígeno solo son válidos si el método de determinación del oxigeno disuelto es capaz de medir dichos niveles con exactitud.

Véase también el punto I.5.2

VI.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

VI.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de ficha de recogida de datos.

ENSAYO DEL FRASCO CERRADO

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre:

Concentración de la solución madre: … mg/l

Concentración inicial en el frasco: … mg/l

DTO/DQO: mg $O_2$/mg de sustancia a examinar

4. **INÓCULO**

Fuente:

Tratamiento realizado:

▼B

Acondicionamiento previo en su caso:

Concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de reacción: … mg/l

5. **DETERMINACIÓN DEL OD**

Método: Winkler/electrodo

**Análisis de los frascos**

| Tiempo de incubación (d) | | | OD (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | |
| Blanco sin sustancia problema | 1 | $C_1$ | | | | |
| | 2 | $C_2$ | | | | |
| Media | $m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$ | | | | | |
| Substancia problema | 1 | $a_1$ | | | | |
| | 2 | $a_2$ | | | | |
| Media | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ | | | | | |

*Nota:* Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. **CORRECCIÓN POR NITRIFICACIÓN** (véase el anexo V)

| Tiempo de incubación (d) | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ |
|---|---|---|---|---|---|
| (i) | Concentración de nitrato (mg N/l) | | | | |
| (ii) | Cambio en la concentración de nitrato (mg N/l) | — | | | |
| (iii) | Equivalente de oxígeno (mg/l) | — | | | |
| (iv) | Concentración de nitrito (mg N/l) | | | | |
| (v) | Cambio en la concentración de nitrito (mg N/l) | — | | | |
| (vi) | Equivalente de oxígeno (mg/l) | — | | | |
| (iii + vi) | Equivalente total de oxígeno (mg/l) | — | | | |

7. **DEPLECIÓN DE OD: % DE DEGRADACIÓN**

| | Depleción tras n días (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | |
| Frasco 1: $(m_{to} - m_{tx}) — (m_{bo} - m_{bx})$ | | | | |
| Frasco 2: $(m_{to} - m_{tx}) — (m_{bo} - m_{bx})$ | | | | |

▼B

| | Depleción tras n días (mg/l) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | |
| Frasco1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{del ensayo} \times \text{DTO sustancia}}$ | | | | |
| Frasco 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{del ensayo} \times \text{DTO sustancia}}$ | | | | |
| $\%\ D\ \text{media}\ (*) = \frac{D_1 + D_2}{2}$ | | | | |

(*) No tener en cuenta si hay una diferencia considerable en las repeticiones.

$m_{to}$ = valor a tiempo 0 en el frasco de la prueba

$m_{tx}$ = valor a tiempo t en el frasco de la prueba

$m_{bo}$ = valor medio del blanco a tiempo 0

$m_{bx}$ = valor medio del blanco a tiempo x

Se aplicará también una corrección según la nitrificación basándose en iii + vi de la sección 6.

8. **DEPLECIÓN DE OD EN EL BLANCO**

Consumo de oxígeno por el blanco: ($m_{bo}$ - $m_{b28}$) mg/l. Este consumo es importante para la validez del ensayo. Debe ser menor de 1,5 mg/l.

PARTE VII. **ENSAYO DEL M.I.T.I.** (Método C.4-F)

VII.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Se mide automáticamente durante un período de 28 días, en un respirómetro cerrado, a 25 ± 1 °C y en la oscuridad, el consumo de oxígeno en una solución o suspensión agitada, de la sustancia problema en un medio mineral, inoculado con un inóculo especial de microorganismos no adaptados. El dióxido de carbono producido es absorbido por cal sodada. La biodegradabilidad se expresa como porcentaje de consumo de oxígeno (corregido según el consumo del blanco) sobre el consumo teórico (DTO). El porcentaje de biodegradabilidad primaria se calcula también basándose en los análisis químicos específicos adicionales hechos al comienzo y al final de la incubación y, opcionalmente, por análisis de COD.

VII.2. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

VII.2.1. **Equipo**

a) Medidor electrolítico automático de DBO o respirómetro normalmente equipado con seis frascos, de 300 ml cada uno y que llevan cápsulas para el absorbente de $CO_2$.

▼B

b) Temperatura ambiente constante o baño maría a 25 °C ± 1 °C o más exacta.

c) Conjunto de membrana y filtros (opcional).

d) Analizador de carbono (opcional).

VII.2.2. **Preparación del medio mineral**

Se prepararán las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de calidad analítica y agua (véase el punto I.6.1):

| | | |
|---|---|---|
| (a) | Ortofosfato diácido de potasio, $KH_2PO_4$ | 8,50 g |
| | Ortofosfato monoácido de potasio, $K_2HPO_4$ | 21,75 g |
| | Ortofosfato monoácido de sodio dodecahidratado $Na_2HPO_4.12\ H_2O$ | 44,60 g |
| | Cloruro amónico, $NH_4Cl$ | 1,70 g |
| | Disolver en agua y enrasar hasta 1 litro | |
| | El pH de la solución debe ser de 7,2 | |
| (b) | Sulfato de magnesio heptahidratado, $MgSO_4$- 7 $H_2O$ | 22,50 g |
| | Disolver en agua y enrasar a 1 litro | |
| (c) | Cloruro cálcido anhidro, $CaCl_2$ | 27,50 g |
| | Disolver en agua y enrasar a 1 litro | |
| (d) | Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $FeCl_3.6\ H_2O$ | 0,25 g |
| | Disolver en agua y enrasar a 1 litro | |

Se toman 3 ml de cada solución (a), (b), (c) y (d) y se enrasa a 1 litro.

VII.2.3. **Preparación del inóculo**

Se recogen muestras frescas de no menos de 10 puntos, sobre todo en zonas donde se utilicen y viertan diversos productos químicos. En los sitios como las instalaciones de tratamiento de aguas residuales, tratamiento industrial de aguas residuales, ríos, lagos, mares, se recogerá muestras de 1 litro de lodo, suelo superficial, agua, etc. y se mezclarán cuidadosamente. Despues de eliminar la materia flotante y de dejar sedimentar, el sobrenadante se ajustará a pH 7 ± 1 con hidróxido sódico o ácido fosfórico.

Se utiliza un volumen adecuado del sobrenadante filtrado para rellenar un recipiente de decantación de lodo activado y se airea el líquido durante 23 h 30 min. Treinta minutos después de detener la aireación, se elimina alrededor de un tercio del volumen total de sobrenadante y se añade al material sedimentado un volumen igual de una solución (pH 7) que contenga 0,1 % respectivamente de glucosa, peptona y ortofosfato monopotásico, volviendo a comenzar la aireación. Este procedimiento se repite una vez al día. La unidad de lodo funcionará de acuerdo con las prácticas correctas: los efluentes deben estar limpios, la temperatura debe permanecer a 25 ± 2 °C, el pH debe ser 7 ± 1, el lodo debe estar bien sedimentado, debe haber aireación suficiente para mantener la mezcla en aerobiosis en todo momento, los protozoos deben estar presentes; al menos cada tres meses se hará un ensayo de la actividad del lodo frente a una sustancia de referencia. No se debe utilizar lodo como inóculo hasta al menos un mes después de la operación, pero no más de cuatro meses después. Posteriormente, tomar muestras de al menos 10 sitios a intervalos regulares, una vez cada tres meses.

▼B

A fin de mantener la misma actividad en el lodo reciente y en el antiguo, se mezcla el sobrenadante filtrado de un lodo activado en uso con un volumen igual de sobrenadante filtrado de una mezcla reciente recogida de diez fuentes y se cultiva el líquido combinado tal como se ha dicho anteriormente. Se toma el lodo para usarlo como inóculo de 18 a 24 horas después de haber alimentado la unidad.

VII.2.4. **Preparación de los frascos**

Se preparan los seis frascos siguientes:

N$^{o}$ 1: sustancia problema en agua de dilución en concentración de 100 mg/l.

N$^{os}$ 2, 3 y 4: sustancia problema en medio mineral en concentración de 100 mg/l.

N$^{o}$ 5: sustancia de referencia (por ejemplo, anilina) en medio mineral en concentración de 100 mg/l.

N$^{o}$ 6: medio mineral solo.

Las sustancias problema poco solubles se añaden directamente calculadas en peso o en volumen o se actúa como se describe en el anexo III, excepto que no se utilizan ni disolventes ni agentes emulsificantes. Se añade el absorbente de $CO_2$ a todos los frascos en las cápsulas especiales. Se ajusta el pH a 7,0 en los frascos n$^{os}$ 2, 3 y 4.

VII.2.5. **Realización del ensayo**

Se inoculan los frascos n$^{os}$ 2, 3 y 4 (suspensiones problema), n$^{o}$ 5 (control de actividad) y n$^{o}$ 6 (blanco con inóculo) con un pequeño volumen del inóculo de manera que dé una concentración de 30 mg/l de sólidos suspendidos. No se añade inóculo al frasco n$^{o}$ 1 que sirve como control abiótico. Se monta el equipo, se controla la impermeabilidad al aire, se ponen en marcha los agitadores y se comienza la medición del consumo de oxígeno en condiciones de oscuridad. Se controla diariamente la temperatura, el agitador y el registrador culombimétrico de consumo de oxígeno, tomando nota de cualquier cambio de color del contenido de los frascos. El consumo de oxígeno se leerá directamente de los seis frascos por un método apropiado, por ejemplo a partir del registrador gráfico de seis puntos, dando lugar a una curva de DBO. Al final de la incubación, normalmente 28 días, se mide el pH del contenido de los frascos y se determina la concentración de la sustancia problema y/o residual y cualquier intermediario y, en el caso de una sustancia soluble en el agua, la concentración de COD (véase el anexo II.4). Se tendrá un cuidado especial en el caso de sustancias volátiles. Si se supone que va a haber nitrificación, se determina la concentración de nitrato y de nitrito en la medida de lo posible.

VII.3. DATOS E INFORME

VII.3.1. **Tratamiento de los resultados**

Se divide el consumo de oxígeno (mg) de la sustancia problema después de un tiempo dado, corregido según el consumo del blanco con inóculo después del mismo tiempo, entre el peso de la sustancia problema utilizada. Con ello obtenemos la DBO expresada en mg de oxígeno/mg de sustancia problema, es decir:

$$\text{DBO} = \frac{\text{mg de consumo de } O_2 \text{ sustancia problema} - \text{mg de } O_2 \text{ consumo blanco}}{\text{mg sustancia problema en el frasco}}$$

= mg $O_2$/mg substancia problema

▼B

La biodegradación porcentual se obtiene de la siguiente manera:

$$\% \text{ biodegradación} = \% \text{ DTO} = \frac{\text{DBO (mg } O_2/\text{mg sustancia)}}{\text{DTO (mg } O_2/\text{mg sustancia)}} \times 100$$

En las mezclas, se calcula la DTO basándose en el análisis elemental, como si fuera una sustancia simple. Se utilizará la DTO adecuada ($DTO_{NH4}$ o $DTO_{NO3}$) según haya nitrificación nula o completa (véase el anexo II.2). No obstante, si hay nitrificación pero es incompleta, se corregirá según el oxígeno consumido por la nitrificación, calculado según los cambios en las concentraciones de nitrito y nitrato (véase el anexo V).

Se calcula el porcentaje de biodegración primaria a partir de la pérdida de sustancia química originaria específica (véase el punto I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Si ha habido en el frasco No. 1 una pérdida de sustancia problema que dé la medida de la eliminación fisicoquímica, se informará de ello y se utilizará la concentración de la sustancia problema ($S_b$) después de 28 días en este frasco para calcular el porcentaje de biodegradación.

Cuando se hagan determinaciones de COD opcional), el porcentaje de biodegradación última se calculará con la siguiente fórmula:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100$$

como se describe en el punto I.7.1. Si ha habido en el frasco nº 1 una pérdida de COD, que mide la eliminación fisicoquímica, se utilizará la concentración de COD en este frasco para calcular el porcentaje de biodegradación.

Se registrarán todos los resultados en la ficha de datos adjunta.

VII.3.2. **Validez de los resultados**

El consumo de oxígeno del blanco con inóculo es normalmente de 20 a 30 mg $O_2$/l y no debe ser mayor de 60 mg/l en 28 días. Los valores superiores a 60 mg/l exigirán una revisión crítica de los datos y de las técnicas experimentales. Si el pH cae fuera del rango 6-8,5 y el consumo de oxígeno con la sustancia problema es menor del 60 %, debe repetirse el ensayo con una concentración inferior de la sustancia problema.

Véase también el punto I.5.2.

Si el porcentaje de degradación de anilina calculado a partir del consumo de oxígeno no excede del 40 % después de 7 días y del 65 % después de 14 días, el ensayo se considerará no válido.

VII.3.3. **Informe**

Véase el punto I.8.

VII.4. FICHA DE RECOGIDA DE DATOS

A continuación se da un ejemplo de una ficha de recogida de datos.

PRUEBA DEL MITI (I)

1. **LABORATORIO**

2. **FECHA DE COMIENZO DE LA PRUEBA**

▼B

3. **SUSTANCIA A EXAMINAR**

Nombre: . . .

Concentración de la solución madre: … mg/l, en sustancia

Concentración inicial en el medio, $C_o$: … mg/l, en sustancia

Volumen de la mezcla de reacción, V: … ml

DTO de la sustancia: … mg $O_2$/l

4. **INÓCULO**

Puntos de muestreo del lodo:

1) …
2) …
3) …
4) …
5) …
6) …
7) …
8) …
9) …
10) …

Concentración de sólidos en suspensión en el lodo activado tras aclimatación con vertidos sintéticos … mg/l

Volumen de lodo activado por litro de medio final = … ml

Concentración de lodo en el medio final = … mg/l

5. **CONSUMO DE OXÍGENO: BIODEGRADABILIDAD**

Tipo de respirómetro usado:

| | | | Tiempo (dias) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| Consumo $O_2$ (mg) de la substancia problema | $a_1$ | | | | | | |
| | $a_2$ | | | | | | |
| | $a_3$ | | | | | | |
| Consumo $O_2$ (mg) blanco | b | | | | | | |
| Consumo $O_2$ corregido (mg) | $(a_1 - b)$<br>$(a_2 - b)$<br>$(a_3 - b)$ | | | | | | |
| DBO por mg de sustancia problema | $\frac{(a-b)}{C_o V}$ | Frasco 1 | | | | | |
| | | Frasco 2 | | | | | |
| | | Frasco 3 | | | | | |
| % degradación $\frac{DBO}{DTO} \times 100$ | | 1 | | | | | |
| | | 2 | | | | | |
| | | 3 | | | | | |
| | | media (*) | | | | | |

(*) No tener en cuenta si hay una diferencia considerable en las repeticiones.

▼B

*Nota:* Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

6. **ANÁLISIS DE CARBONO** (opcional)

Analizador de carbono:

| Matraz | COD | | | | % COD eliminado | Media |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Medido | | Corregido | | | |
| Agua + sustancia a examinar | a | | | | | |
| Lodo + sustancia a examinar | $b_1$ | | $b_1$-c | | | |
| Lodo + sustancia a examinar | $b_2$ | | $b_2$-c | | | |
| Lodo + sustancia a examinar | $b_3$ | | $b_3$-c | | | |
| Control blanco | c | | — | | | |

$$\% \text{ COD eliminado} = \frac{a_1 - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **DATOS DEL ANÁLISIS QUÍMICO ESPECÍFICO**

| | Cantidad residual de sust. problema al final del ensayo | % degradación |
|---|---|---|
| Ensayo blanco con agua | $S_b$ | |
| Medio inoculado | $S_{al}$ | |
| | $S_{a2}$ | |
| | $S_{a3}$ | |

$$\%\text{degradación} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Calcular % de degradación de los frascos $a_1$ $a_2$ y $a_3$ respectivamente.

8. **COMENTARIOS**

Se adjuntará una curva de DBO en función del tiempo, si se disponede ella.

▼B

*Anexo I*

**ABREVIATURAS Y DEFINICIONES**

OD: Oxígeno disuelto (mg/l); es la concentración de oxígeno disuelto en una muestra acuosa.

DBO: Demanda bioquímica de oxígeno (g); es la cantidad de oxígeno consumido por los microorganismos que metabolizan una sustancia problema; se expresa también como gramos de oxígeno consumido por gramo de sustancia problema. (Véase el método C.5.).

DQO: Demanda química de oxígeno (g); es la cantidad de oxígeno consumido durante la oxidación de una sustancia problema con dicromato en medio ácido caliente. Proporciona una medida de la cantidad de sustancia oxidable presente; se expresa también como gramos de oxígeno consumido por gramo de sustancia problema. (Véase el método C.6.)

COD: Carbono orgánico disuelto; es el carbono orgánico presente en solución o el que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros o permanece en el sobrenadante tras centrifugación a 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) durante 15 minutos.

DTO: Demanda teórica de oxígeno (mg); es la cantidad total de oxígeno necesario para oxidar completamente una sustancia; se calcula basándose en la fórmula molecular (véase el anexo II.2) y se expresa también como mg de oxígeno requeridos por mg de sustancia problema.

$CO_2T$: Dióxido de carbono teórico (mg); es la cantidad de dióxido de carbono que se calcula que va a producirse a partir del contenido en carbono, conocido o medido, de la sustancia problema cuando se mineraliza completamente; se expresa también como mg de dióxido de carbono producido por mg de sustancia de ensayo.

COT: Carbono orgánico total; es la suma total del carbono orgánico en solución y en suspensión en una muestra.

CI: Carbono inorgánico,

CT: Carbono total; es el total del carbono orgánico e inorgánico presente en una muestra.

*Biodegradación primaria:*

Es la alteración de la estructura química de una sustancia, producida por acción biológica y que da lugar a la pérdida de las propiedades específicas de esa sustancia.

*Biodegradación última (aerobia):*

Es el nivel de degradación al que llega la sustancia de ensayo cuando es totalmente utilizada por microorganismos dando lugar a la producción de dióxido de carbono, agua, sales minerales y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).

*Fácilmente biodegradable:*

Categoría arbitraria de sustancias químicas que han pasado determinados ensayos específicos de clasificación en cuanto a la biodegradabilidad última; estos ensayos son tan estrictos que es asumido que, según ellos, estos compuestos deben degradarse rápida y completamente en medio ambiente acuático en condiciones de aerobiosis.

▼B

*Intrínsecamente biodegradable:*

Categoría de sustancias químicas en las que hay evidencia inequívoca de biodegradación (primaria o última) en un ensayo de biodegradabilidad reconocido.

*Tratabilidad:*

Es la capacidad de las sustancias de ser eliminadas durante el tratamiento biológico de los residuos acuosos sin afectar negativamente ai funcionamiento normal de los procesos de tratamiento. Generalmente, los compuestos fácilmente biodegradables son tratables, pero no todos los compuestos intrínsecamente biodegradables son tratables. Pueden darse también procesos abióticos.

*Tiempo de latencia*

En una prueba de pérdida, es el tiempo transcurrrido desde la inoculación hasta que el porcentaje de degradación aumenta hasta al menos el 10 %. El tiempo de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

*Tiempo de degradación*

Es el tiempo transcurrido desde el final del tiempo de latencia hasta el momento en que se alcanza el 90 % del nivel máximo de degradación.

*Período de observación de 10 días*

Son los 10 días que siguen inmediatamente al momento en que se alcanza el 10 % de degradación.

▼B

*Anexo II*

## CÁLCULO Y DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS INDICATIVOS ADECUADOS

Dependiendo del método elegido, se necesitarán determinados parámetros indicativos. La sección siguiente describe el cálculo de esos valores. El uso de estos parámetros se describe en cada uno de los métodos.

1. **Contenido en carbono**

El contenido en carbono se calcula basándose en la composición elemental conocida o determinada por análisis elemental de la sustancia problema.

2. **Demanda teórica de oxígeno (DTO)**

La demanda teórica de oxígeno (DTO) puede calcularse si se conoce la composición.elemental o se determina mediante análisis elemental. Para un compuesto:

$C_cH_hCl_dN_nNa_{na}O_0P_pS_s$

sin nitrificación,

$$DTO_{NH4} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl - 3\ n) + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{Pm}\ mg/mg$$

o con nitrification

$$DTO_{NO3} = \frac{16\ [2\ c + 1/2\ (h - cl) + 5/2\ n + 3\ s + 5/2\ p + 1/2\ na - o]}{Pm}\ mg/mg$$

3. **Demanda química de oxígeno (DQO)**

La demanda química de oxígeno (DQO) se determina de acuerdo con el método C.6.

4. **Carbono orgánico disuelto (COD)**

El carbono orgánico disuelto (COD) es, por definición, el carbono orgánico de cualquier sustancia o mezcla de sustancias en agua que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros.

Se toman muestras de los recipientes de ensayo y se filtran inmediatamente en el equipo de filtración utilizando un filtro de membrana adecuado. Se desprecian los primeros 20 ml de filtrado (puede disminuirse la cantidad si se utilizan filtros más pequeños). Si se inyectan volúmenes de 10 a 20 ml o menores (el volumen depende de la cantidad necesaria para el analizador de carbono), se guardan para el análisis de carbono. La concentración de COD se determina mediante un analizador de carbono orgánico capaz de medir exactamente una concentración de carbono equivalente o inferior al 10 % de la concentración de COD inicial utilizada en el ensayo.

Las muestras filtradas que no puedan analizarse en el mismo día de trabajo pueden conservarse almacenadas en un refrigerador a 2-4 $^{o}$C durante 48 horas, o por debajo de - 18 $^{o}$C durante períodos más prolongados.

*Comentarios:*

Los filtros de membrana vienen a menudo impregnados con agentes tensoactivos para hacerlos hidrófilos. Así pues, el filtro puede contener varios mg de carbono orgánico soluble que puede interferir en las determinaciones de biodegradabilidad. Los agentes tensoactivos y otros compuestos orgánicos solubles se eliminan de los filtros hirviendo éstos en agua desionizada durante tres períodos de 1 hora cada uno. Los filtros pueden almacenarse a continuación en agua durante una semana. Si se utilizan cartuchos de filtro de un solo uso, cada lote debe controlarse para confirmar que no libera carbono orgánico soluble.

▼B

Dependiendo del tipo de filtro de membrana, la sustancia puede ser retenida por absorción. Por ello, es aconsejable asegurarse de que la sustancia problema no queda retenida en el filtro.

Puede usarse centrifugación, en lugar de filtración, a 40 000 $m.sec^{-2}$ (4 000 g) durante 15 minutos para diferenciar el COT del COD. El método no es fiable con una concentración inicial < 10 mg COD/l ya que ni se eliminan todas las bacterias ni se redisuelve el carbono que forma parte del plasma bacteriano.

*REFERENCIAS*


— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, Vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38409 Teil 41 — Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersu chung, Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoff bedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P. The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13 (1), 169.

▼B

*Anexo III*

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE LAS SUSTANCIAS POCO SOLUBLES**

Debe prestarse una atención especial, en los ensayos de biodegradabilidad de sustancias poco solubles, a los aspectos siguientes.

Aunque los líquidos homogéneos rara vez presentarán problemas de muestreo, se recomienda homogeneizar los materiales sólidos por medios apropiados para evitar errores debidos a la no homogeneidad. Debe prestarse una atención especial cuando se necesiten muestras representativas de unos miligramos tomadas de mezclas de sustancias químicas o de sustancias con grandes cantidades de impurezas.

Pueden utilizarse durante los ensayos diversas formas de agitación. Debe tenerse cuidado de usar solo la agitación suficiente para mantener la dispersión de la sustancia, evitando el sobrecalentamiento, la formación excesiva de espuma y las fuerzas de cizallamiento excesivas.

Puede utilizarse un emulsificante que dé una dispersión estable de la sustancia química. Debe ser atóxico para las bacterias y no debe biodegradarse ni producir espuma en las condiciones del ensayo.

Se aplicarán a los solventes los mismos criterios que a los emulsificantes.

No se recomienda utilizar vehículos sólidos para los ensayos de sustancias sólidas, pero pueden ser adecuados en el caso de sustancias oleosas.

Cuando se utilicen sustancias auxiliares corno emulsificantes, solventes y portadores, debe realizarse un ensayo en blanco con las sustancias auxiliares.

Puede utilizarse para estudiar la biodegradabilidad de las sustancias poco solubles cualquiera de los tres ensayos respirométricos $CO_2$, DBO o MITI.

*REFERENCIAS*

— de Morsier, A. et al. Biodegradation tests for poorly- soluble compounds. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 833.

— Gerike, P. The Biodegradabiliry testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, Vol. 13, 169.

▼B

*Anexo IV*

**EVALUACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD DE SUSTANCIAS QUÍMICAS QUE PUEDEN SER TÓXICAS PARA EL INÓCULO**

Cuando se someta una sustancia química a ensayos de biodegradabilidad fácil y se vea que no es biodegradable, se recomienda el procedimiento siguiente si se desea distinguir si la sustancia es inhibidora o es inerte (Reynolds et al.; 1987).

Deben utilizarse inóculos similares o idénticos para los ensayos de toxicidad y de biodegradación.

Cuando se considere necesario disponer de un medio para valorar la toxicidad de las sustancias químicas estudiadas en los ensayos de biodegradabilidad fácil, puede ser apropiado aplicar uno o varios de los métodos siguientes: inhibición de la tasa de respiración del lodo (ensayo de inhibición de respiración del lodo activado — Directiva 88/302/CEE), DBO o inhibición del crecimiento.

Si hay que evitar la inhibición debida a la toxicidad, se sugiere que las concentraciones de la sustancia problema utilizadas en las pruebas de biodegradabilidad fácil sean inferiores a 1/10 de la $CE_{50}$ (o inferiores a los valores de la $CE_{20}$) obtenida en los ensayos de toxicidad. No es probable que sustancias con una $CE_{50}$ superior a 300 mg/l tengan efectos tóxicos en los ensayos de biodegradabilidad fácil.

Los valores $EC_{50}$ inferiores a 20 mg/l pueden presentar problemas en las pruebas subsiguientes. Se emplearán bajas concentraciones de ensayo, haciendo necesario el uso de pruebas sensibles y estrictas como el ensayo del frasco cerrado o el uso de material marcado con $^{14}C$. Como alternativa, un inóculo aclimatado puede permitir el uso de concentraciones más elevadas de la sustancia problema. En este último caso, sin embargo, se pierde el criterio específico del ensayo de biodegradabilidad fácil.

*REFERENCIAS*

Reynolds, L. et al. Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, Vol. 16, 2259.

▼B

*Anexo V*

## CORRECCIÓN DEL CONSUMO DE OXÍGENO POR INTERFERENCIA DE LA NITRIFICACIÓN

Si la sustancia problema no contiene nitrógeno, los errores debidos a no tener en cuenta la nitrificación, en el cálculo del consumo de oxígeno, son despreciables (no superiores al 5 %), incluso si la oxidación del N amónico en el medio se da irregularmente en los distintos recipientes de ensayo y blanco. No obstante, en el caso de sustancias que contienen N, pueden darse errores graves.

Si ha habido nitrificación pero no es completa, el consumo de oxígeno que se ha observado en la mezcla de reacción puede corregirse según la cantidad de oxígeno utilizado para oxidar el amonio a nitrito y nitrato, sí se determinan los cambios en la concentración del nitrito y del nitrato durante la incubación mediante las ecuaciones siguientes:

$$2\ NH_4Cl + 3\ O_2 = 2\ HNO_2 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (1)$$

$$2\ HNO_2 + O_2 = 2\ HNO_3 \quad (2)$$

Globalmente:

$$2\ NH_4Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HC1 + 2\ H_2O \quad (3)$$

En la ecuación (1) el consumo de oxigeno por 28 g de nitrógeno contenidos en cloruro amónico ($NH_4Cl$) al ser oxidado a nitrito es de 96 g, es decir, un factor de 3,43 (96/28). Del mismo modo, en la ecuación (3) el consumo de oxígeno por 28 g de nitrógeno al ser oxidado a nitrato es de 128 g, es decir, un factor de 4,57 (128/28).

Como las reacciones son *secuenciales*, desencadenadas por especies bacterianas diferentes bien determinadas, es posible que la concentración de nitrito aumente o disminuya; en este último caso, se formará una concentración equivalente de nitrato. Así pues, el oxígeno consumido en la formación de nitrato es 4,57 multiplicado por el aumento de la concentración de nitrato, mientras que el oxígeno relacionado con la formación de nitrito es 3,43 multiplicado por el aumento en la concentración de nitrito o bien con la disminución de su concentración, la pérdida de oxígeno es -3,43 multiplicado por la disminución de la concentración.

Es decir:

$O_2$ consumido en la formación de nitrato-N = 4,57 × aumento en la concentración de nitrato *Y* (4)

$O_2$ consumido en la formación de nitrito-N = 3,43 × aumento en la concentración de nitrito (5)

y

$O_2$ perdido en la desaparición de nitrito-N = -3,43 × disminución en la concentración de nitrito de forma que (6)

consumo de $O_2$ debido a la nitrificación = ± 3,43 × cambio en concentración de nitrito-N + 4,57 × aumento en concentración de nitrato (7)

y, por consiguiente,

consumo de $O_2$ debido a oxidación del C = consumo total observado menos consumo debido a nitrificación (8)

Si solo se determina el N oxidado total, puede considerarse que el consumo de oxígeno debido a la nitrificación es, como primera aproximación, 4,57 × aumento del N oxidado.

El valor corregido del consumo de oxígeno debido a la oxidacion del C se compara entonces con la DTO $NH_4$ tal como se calcula en el anexo II.

▼B

## C.5. DEGRADACIÓN: DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del ensayo es medir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de las sustancias orgánicas, sólidas o líquidas.

Los resultados que se obtienen con este método de ensayo son representativos, sobre todo, cuando se aplica a los compuestos hidrosolubles; no obstante, al menos en principio, el método puede hacerse extensible a los compuestos volátiles y los compuestos de baja hidrosolubilidad.

El método solo es aplicable a las sustancias orgánicas que no produzcan efectos inhibidores sobre las bacterias a la concentración de ensayo. Si la sustancia de ensayo no es soluble a la concentración de ensayo, se puede recurrir a procedimientos especiales, tales como la dispersión por ultrasonidos, a fin de lograr una dispersión satisfactoria de la sustancia de ensayo.

Es conveniente disponer de información sobre la toxicidad de la sustancia para poder interpretar los resultados bajos y para elegir la concentración de ensayo adecuada.

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La DBO se define como la masa de oxígeno disuelto necesario para asegurar, en condiciones determinadas, la oxidación bioquímica de un volumen dado de una solución de la sustancia sometida a ensayo.

Los resultados se expresan en gramos de DBO por gramo de sustancia de prueba.

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Es conveniente la utilización de una sustancia de referencia apropiada para verificar la actividad del inóculo.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se siembra con microorganismos y se incuba en la oscuridad a una temperatura ambiente constante dada, una cantidad determinada de sustancia, disuelta o dispersa en un medio apropiado y aireado.

La DBO se determina por la diferencia entre el contenido en oxígeno disuelto al principio y al final del ensayo. La duración mínima del ensayo es de cinco días y la máxima, de 28.

Debe efectuarse un ensayo paralelo en blanco, sin sustancia de ensayo.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

La determinación de la DBO no puede considerarse como una determinación válida de la biodegradabilidad de la sustancia. Esta prueba solo puede considerarse como prueba exploratoria.

#### 1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se prepara una solución o una dispersión preliminar de la sustancia, con el fin de obtener una concentración de DBO compatible con el método utilizado. La DBO se determina entonces aplicando un método nacional o internacional normalizado que sea apropiado.

▼B

2. **RESULTADOS Y EVALUACIÓN**

La DBO contenida en la solución preliminar se calcula según el método normalizado elegido y se expresa en gramos de DBO por gramo de sustancia de ensayo.

3. **INFORME**

Debe indicarse el método utilizado.

La demanda bioquímica de oxígeno debe ser la media de al menos tres mediciones válidas.

Para facilitar la interpretación de los resultados deben incluirse todos los datos y observaciones que sean pertinentes, especialmente en lo referente a impurezas, estado físico, efectos tóxicos y propiedades específicas de la sustancia que puedan afectar a los resultados.

Debe mencionarse si se ha utilizado un aditivo inhibidor de la nitrificación biológica.

4. REFERENCIAS

Lista de métodos normalizados, por ejemplo:

NF T 90-103: Determination of the Biochemical Oxygen Demand

NBN 407: Biochemical Oxygen Demand

NBN 3235 5.4: Bepaling van het biochemisch zuurstofverbruik (BZV)

The Determination of Biochemical Oxygen Demand, Methods for the Examination of Water and Associates Materials, HMSO, Londres.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

## C.6. DEGRADACIÓN: DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO

### 1. MÉTODO

#### 1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del ensayo es medir la demanda química de oxígeno (DQO) de las sustancias orgánicas, sólidas o líquidas, mediante la aplicación de cualquier procedimiento normalizado, en condiciones de laboratorio determinadas.

Es conveniente disponer de información sobre la fórmula de la sustancia para facilitar la realización del ensayo y la interpretación de los resultados obtenidos (por ejemplo, sales halógenas, sales ferrosas de compuestos orgánicos, compuestos organoclorados).

#### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La demanda química de oxígeno es la medida de la oxidabilidad de una sustancia, definida como la cantidad equivalente en oxígeno de un reactivo oxidante consumida por la sustancia en condiciones de laboratorio determinadas.

El resultado se expresa en gramos de DQO por gramo de sustancia de ensayo.

#### 1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

No es preciso emplear sustancias de referencia cada vez que se analiza una nueva sustancia. Dichas sustancias de referencia sirven, principalmente, para calibrar periódicamente el método y permitir la comparación de resultados cuando se apliquen métodos distintos.

#### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Una cantidad determinada de sustancia, disuelta o dispersa en agua, se oxida con dicromato de potasio en presencia de ácido sulfúrico concentrado, con catalizador de sulfato de plata, en caliente y con reflujo durante dos horas. El dicromato residual se valora con ayuda de sulfato ferroso amónico titulado.

En el caso de las sustancias con cloro, se debe añadir sulfato mercúrico (las soluciones que contienen sales de mercurio deben ser tratadas, después de su utilización, pra evitar que pase mercurio al medio ambiente) para atenuar la interferencia de los cloruros.

#### 1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Dada la arbitrariedad del método de determinación de la DQO, ésta debe considerarse como un «indicador de oxidabilidad» y se utiliza en calidad de tal como método práctico de evaluación de la materia orgánica.

Los cloruros pueden interferir en este ensayo; las sustancias inorgánicas reductoras u oxidantes pueden interferir igualmente con la determinación de la DQO.

Algunos compuestos cíclicos y muchas sustancias volátiles (p.ej., ácidos grasos de cadena corta) no se oxidan totalmente durante el ensayo.

#### 1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se prepara una solución o una dispersión preliminar de la sustancia, para conseguir una DQO de 250 a 600 mg por litro.

▼B

*Notas:*

Cuando se trata de sustancias poco solubles y que no se dispersan, se puede pesar una cantidad de sustancia finamente pulverizada, o en estado líquido, correspondiente a unos 5 mg de DQO, e introducirla en el aparato experimental añadiendo agua.

La demanda química de oxígeno (DQO) se determina a menudo mejor, sobre todo en el caso de sustancias poco solubles, con una variante del método, es decir, en un sistema cerrado con ecualizador de presión (H. Kellcenberg, 1975). Con esta modificación puede conseguirse cuantificar sustancias que se determinan con mucha dificultad cuando se usa el método convencional (por ejemplo, ácido acético). Sin embargo, el método falla igualmente en el caso de la piridina. Si se alcanza una concentración de dicromato potásico de 0,25 N (0,0416 M), como se prescribe en la referencia (1), se facilita la adición directa de 5-10 mg de sustancia, lo que resulta esencia] para la determinación de la DQO de las sustancias poco hidrosolubles [referencia (2)].

Por lo demás, la DQO se determina a continuación aplicando cualquier método nacional o internacional normalizado que sea adecuado.

2. **RESULTADOS Y EVALUACIÓN**

Se calcula la DQO contenida en el frasco experimental según el método normalizado elegido y se expresa en gramos de DQO por gramo de sustancia de ensayo.

3. **INFORME**

Debe indicarse el método utilizado.

La demanda química de oxigeno debe ser la media de al menos tres mediciones. Se incluirán iodos los datos y observaciones que puedan facilitai la interpretación de los resultados, especialmente los referentes a impurezas estado físico y propiedades especificas de la sustancia (si se conocen) que puedan afectar a los resultados.

Debe mencionarse si se na usado sulfato mercurico para reducir la interferencia de los cloturos.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) Kelkenberg, H., Z. von Wasser und Abwasssrforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike, P. The biodegradibility testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Lista de métodos normalizados, por ejemplo:

NBN T 91-201 Determination of the Chemical Oxygen Demand

ISBN 0 11 7512494 Chemical Oxygen Demand (dichromate value) of polluted and waste waters

NF T 90-101 Determination of the Chemical Demand

DS 217 — Water Determination of the Chemical Oxygen Demand

Analysis

DIN 38409-H-41 Determination of the Chemical Oxygen Demand (COD) within the range above 15 mg/l

KEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik

ISO 6060 Water Quality: Chemical Oxygen Demand Dichromate Methods

▼B

## C.7. DEGRADACIÓN — DEGRADACIÓN ABIÓTICA: HIDRÓLISIS EN FUNCIÓN DEL pH

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 111 (2004).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Las sustancias químicas pueden llegar a las aguas superficiales por vías como la aplicación directa, los aerosoles erráticos, la escorrentía, el drenaje, la eliminación de residuos, los efluentes industriales, domésticos o agrícolas y la deposición atmosférica, y pueden transformarse en dichas aguas mediante procesos químicos (por ejemplo, hidrólisis, oxidación), fotoquímicos y microbianos. Las presentes directrices describen un método de ensayo de laboratorio para evaluar la transformación hidrolítica abiótica de sustancias químicas en sistemas acuáticos a valores de pH que se encuentran normalmente en el medio ambiente (pH de 4 a 9) y se basa en otras directrices anteriores [(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7)].

Con los experimentos se pretende determinar: i) la velocidad de hidrólisis de la sustancia problema en función del pH, y ii) la identidad o naturaleza y las velocidades de formación y destrucción de los productos de hidrólisis a los que pueden estar expuestos los organismos. Tales estudios pueden ser necesarios en relación con sustancias que se aplican directamente al agua o que pueden llegar al medio ambiente por las otras vías antes citadas.

### 1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

Véase el anexo 2.

### 1.3. APLICABILIDAD DEL MÉTODO

El método es aplicable en general a todas las sustancias químicas (tanto marcadas como sin marcar) para las que se disponga de un método analítico de suficiente exactitud y sensibilidad. Es aplicable a compuestos ligeramente volátiles y no volátiles que tengan la suficiente hidrosolubilidad. El ensayo no debe aplicarse a sustancias químicas que sean muy volátiles a partir del agua (por ejemplo, fumigantes o disolventes orgánicos) y, por tanto, no se puedan mantener en solución en las condiciones experimentales del ensayo. Puede ser difícil efectuar el ensayo con sustancias muy poco hidrosolubles (8).

### 1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se tratan con la sustancia problema soluciones acuosas estériles amortiguadoras con diferentes valores de pH (pH de 4, 7 y 9), y se incuban en la oscuridad en condiciones de laboratorio controladas (a temperaturas constantes). A intervalos determinados, se analiza el contenido de sustancia problema y de productos de su hidrólisis en las soluciones amortiguadoras. Si se utiliza una sustancia problema marcada (por ejemplo, $^{14}C$) es más fácil calcular el balance de masa.

Este método de ensayo está diseñado según un enfoque secuencial que se muestra y explica en el anexo 1. A cada etapa de la secuencia se pasa en función de los resultados de la etapa anterior.

▼B

1.5. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Para medir la velocidad de hidrólisis puede utilizarse una sustancia problema marcada o sin marcar. Generalmente se prefiere utilizar material marcado para estudiar la ruta de la hidrólisis y para establecer el balance de masa; sin embargo, el marcado puede no ser absolutamente necesario en casos especiales. Se recomienda el marcado con $^{14}C$, pero también puede resultar de utilidad el uso de otros isótopos, tales como $^{13}C$, $^{15}N$ o $^{3}H$. En la medida de lo posible, el marcador debe ubicarse en la parte o partes más estables de la molécula. Por ejemplo, si la sustancia problema contiene un solo anillo, es preciso marcar ese anillo; si contiene dos o más anillos, puede resultar necesario efectuar estudios separados para evaluar el destino de cada anillo marcado y obtener información adecuada sobre la formación de los productos de hidrólisis. La pureza de la sustancia problema debe ser de al menos del 95 %.

Antes de llevar a cabo un ensayo de hidrólisis, debe disponerse de la información siguiente sobre la sustancia problema:

a) hidrosolubilidad (método de ensayo A.6);

b) solubilidad en disolventes orgánicos;

c) presión de vapor (método de ensayo A.4) o constante de la ley de Henry;

d) coeficiente de reparto n-octanol/agua (método de ensayo A.8);

e) constante de disociación ($pK_a$) (directrices OCDE 112) (9);

f) velocidad de fototransformación directa e indirecta en agua, en su caso.

Debe disponerse de métodos analíticos de cuantificación de la sustancia problema y, cuando sea pertinente, de identificación y cuantificación de los productos de su hidrólisis en soluciones acuosas (véase también el punto 1.7.2).

1.6. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

A ser posible, deben utilizarse sustancias de referencia para la identificación y cuantificación de los productos de la hidrólisis mediante métodos espectroscópicos y cromatográficos, u otros métodos con la sensibilidad adecuada.

1.7. CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1. **Recuperación**

Mediante el análisis de soluciones amortiguadoras, cuando menos con dos réplicas en paralelo, o de sus extractos inmediatamente después de la adición de la sustancia problema se obtiene una primera indicación de la repetibilidad del método analítico y de la uniformidad del procedimiento de aplicación de la sustancia problema. Los valores de recuperación correspondientes a etapas posteriores de los experimentos los dan los balances de masa respectivos (cuando se utiliza material marcado). Las tasas de recuperación tienen que oscilar entre el 90 % y el 110 % de las sustancias tanto marcadas como sin marcar (7). En caso de que sea técnicamente difícil llegar a esta banda, puede aceptarse una recuperación del 70 % de sustancias sin marcar, pero debe justificarse la situación.

▼B

1.7.2. **Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

La repetibilidad del método o métodos analíticos utilizados para cuantificar la sustancia problema y los productos de hidrólisis posteriormente puede comprobarse mediante análisis de réplicas en paralelo de las mismas soluciones amortiguadoras (o de sus extractos) después de que se hayan formado cantidades de productos de hidrólisis suficientes para su cuantificación.

El método analítico debe tener la sensibilidad suficiente para cuantificar concentraciones de sustancia problema iguales o inferiores al 10 % de la concentración inicial. En su caso, los métodos analíticos deben tener también la suficiente sensibilidad para cuantificar cualquier producto de hidrólisis que represente el 10 % o más de la cantidad aplicada (en cualquier momento a lo largo del estudio) hasta el 25 % o menos de su concentración máxima.

1.7.3. **Intervalos de confianza de los datos cinéticos de la hidrólisis**

Deben calcularse y presentarse los intervalos de confianza de todos los coeficientes de regresión, constantes de velocidad, semividas y cualesquiera otros parámetros cinéticos (por ejemplo, TD50).

1.8. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.8.1. **Equipo y material**

El estudio debe realizarse en recipientes de vidrio (por ejemplo, tubos de ensayo, frascos pequeños) en condiciones estériles y de oscuridad, en caso necesario, salvo que se disponga de información previa (como el coeficiente de reparto n-octanol/agua) que indique la posibilidad de adherencia de la sustancia problema al vidrio. En tal situación, puede ser necesario considerar la utilización de otros materiales (como el teflón). También puede caber la posibilidad de solucionar el problema de la adherencia al vidrio con uno o más de los métodos siguientes:

— determinación de la masa de la sustancia problema y productos de hidrólisis que adsorbe el recipiente de ensayo,

— empleo de un baño de ultrasonidos,

— lavado con disolventes de todo el material de vidrio en cada intervalo de muestreo,

— utilización de productos formulados,

— uso de una cantidad mayor de cosolvente para añadir la sustancia problema al sistema; si se utiliza un cosolvente, éste no debe hidrolizar la sustancia problema.

Normalmente es necesario utilizar agitadores de baños de agua con temperatura controlada o incubadores termostáticos para la incubación de las diversas soluciones problema.

Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

— pHmetro;

▼B

— instrumentos analíticos tales como equipos de cromatografía (de gases, de líquidos de alta resolución o de capa fina), incluidos los sistemas de detección adecuados para el análisis de sustancias radiomarcadas y sin marcar o un método inverso de dilución isotópica,

— instrumentos de identificación (por ejemplo, espectrometría de masas, cromatografía de gases con espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta resolución con espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, etc.),

— contador de centelleo de líquidos,

— ampollas de decantación para la extracción líquido-líquido;

— instrumental para concentrar soluciones y extractos (por ejemplo, evaporador rotatorio);

— equipo de control de la temperatura (por ejemplo, baño de agua).

Entre los reactivos químicos figuran, por ejemplo:

— disolventes orgánicos, con grado analítico de pureza, tales como hexano, diclorometano, etc.,

— líquido de centelleo,

— soluciones amortiguadoras (véase el punto 1.8.3).

Debe esterilizarse todo el material de vidrio, así como el agua de grado reactivo y las soluciones amortiguadoras que se utilicen en los ensayos de hidrólisis.

1.8.2. **Aplicación de la sustancia problema**

La sustancia problema debe añadirse como solución acuosa a las diferentes soluciones amortiguadoras (véase el anexo 3). Cuando sea necesario para conseguir una disolución adecuada, se permite utilizar pequeñas cantidades de disolventes miscibles con el agua (como acetonitrilo, acetona o etanol) para la aplicación y distribución de la sustancia problema, pero sin sobrepasar en principio el 1 % v/v. Cuando se desee recurrir a una concentración superior de disolventes (por ejemplo, en caso de sustancias problema poco solubles), esta podría autorizarse solo si se demuestra que el disolvente no afecta a la hidrólisis de la sustancia problema.

No se recomienda en principio el uso de productos formulados, ya que no puede excluirse que los componentes de la formulación influyan sobre el proceso de hidrólisis. Sin embargo, cuando se trate de sustancias problema poco hidrosolubles o que se adhieran al vidrio (véase el punto 1.8.1), puede ser una alternativa adecuada el empleo de material formulado.

Debe utilizarse una sola concentración de la sustancia problema, sin pasar de 0,01 M o de la mitad de la concentración de saturación (véase el anexo 1).

▼B

1.8.3. **Soluciones amortiguadoras**

El ensayo de hidrólisis debe efectuarse a pH de 4, 7 y 9. Para conseguirlo, deben prepararse soluciones amortiguadoras utilizando agua y sustancias de grado reactivo. En el anexo 3 se presentan varios sistemas amortiguadores útiles. Debe observarse que el sistema amortiguador utilizado puede afectar a la velocidad de la hidrólisis; en caso de que sea así, debe emplearse otro sistema amortiguador ([1]).

Debe comprobarse el pH de cada solución amortiguadora con un pHmetro calibrado que tenga una precisión mínima de 0,1 a la temperatura necesaria.

1.8.4. **Condiciones del ensayo**

1.8.4.1. *Temperatura del ensayo*

Los experimentos de hidrólisis deben efectuarse a temperatura constante. A efectos de extrapolación, es importante que la variación máxima de la temperatura sea de ± 0,5 $^{o}$C.

Debe realizarse un ensayo preliminar (etapa 1) a la temperatura de 50 $^{o}$C si no se conoce el comportamiento hidrolítico de la sustancia problema. Deben efectuarse ensayos cinéticos de etapas superiores con un mínimo de tres temperaturas (incluido el ensayo a 50 $^{o}$C), salvo que la sustancia problema sea estable frente a la hidrólisis según el ensayo de la etapa 1. Se sugiere la banda de temperaturas de 10-70 $^{o}$C (de preferencia con al menos una temperatura por debajo de 25 $^{o}$C), que incluye la temperatura de 25 $^{o}$C consignada en el informe y la mayoría de las temperaturas observadas sobre el terreno.

1.8.4.2. *Luz y oxígeno*

Todos los ensayos de hidrólisis deben realizarse siguiendo un método adecuado para evitar efectos fotolíticos. Deben tomarse todas las medidas necesarias para evitar la presencia de oxígeno (por ejemplo, burbujeando helio, nitrógeno o argón durante 5 minutos antes de la preparación de la solución).

1.8.4.3. *Duración del ensayo*

El ensayo preliminar debe efectuarse durante cinco días, mientras que los ensayos de etapas más avanzadas deben mantenerse hasta conseguir la hidrólisis del 90 % de la sustancia problema, o bien durante 30 días si este plazo es más breve.

1.8.5. **Realización del ensayo**

1.8.5.1. *Ensayo preliminar (etapa 1)*

El ensayo preliminar se efectúa a 50 ±0,5 $^{o}$C y a un pH de 4,0, 7,0 y 9,0. Si al cabo de cinco días se observa menos del 10 % de hidrólisis ($t_{0,525}$ $^{o}$C > 1 año), se considera que la sustancia problema es hidrolíticamente estable y, en principio, no es necesario hacer más ensayos. Si se sabe que la sustancia es inestable a temperaturas pertinentes para el medio ambiente ([2]), no es necesario efectuar el ensayo preliminar. El método analítico debe tener la precisión y sensibilidad suficientes para detectar una reducción del 10 % de la concentración inicial.

([1]) Mabey y Mill recomiendan los amortiguadores de borato o acetato en lugar de los de fosfato (11).

([2]) Esta información puede proceder de fuentes distintas, como datos bibliográficos de la hidrólisis de compuestos similares estructuralmente o mediante otros ensayos preliminares semicuantitativos de hidrólisis de la sustancia problema en una fase anterior del desarrollo.

▼B

1.8.5.2. *Hidrólisis de sustancias inestables (etapa 2)*

El ensayo en etapas superiores debe realizarse a los valores de pH a los que se haya visto que la sustancia problema es inestable según el ensayo preliminar antes citado. Las soluciones amortiguadoras de la sustancia problema deben mantenerse constantemente a las temperaturas seleccionadas. Para hacer un ensayo respecto a una cinética de primer orden, cada solución de reacción debe analizarse a intervalos que proporcionen datos de un mínimo de seis puntos espaciados, normalmente entre el 10 % y el 90 % de hidrólisis de la sustancia problema. Deben tomarse muestras distintas en paralelo (un mínimo de dos réplicas procedentes de recipientes de reacción diferentes) para analizar su contenido en, como mínimo, 6 momentos de muestreo (para tener un mínimo de 12 puntos de datos en paralelo). Se considera inadecuado utilizar una sola solución a granel de la que se van tomando alícuotas individuales de la solución problema tras cada intervalo de muestreo, ya que esto no permite el análisis de la variabilidad de los datos y puede provocar problemas de contaminación de la solución problema. Deben realizarse pruebas de confirmación de la esterilidad al final del ensayo en etapas superiores (es decir, con el 90 % de hidrólisis o a los 30 días). Sin embargo, si no se observa ninguna degradación (es decir, transformación) no es necesario realizar pruebas de esterilidad.

1.8.5.3. *Identificación de los productos de la hidrólisis (etapa 3)*

Con métodos analíticos adecuados, deben identificarse todos los productos importantes de la hidrólisis, al menos los que representen una proporción > 10 % de la dosis aplicada.

1.8.5.4. *Ensayos facultativos*

Puede ser necesario efectuar ensayos complementarios con valores de pH distintos de 4, 7 y 9 en relación con sustancias problema hidrolíticamente inestables. Así, puede ser necesario por motivos fisiológicos efectuar un ensayo en condiciones más ácidas (por ejemplo, a un pH de 1,2) utilizando una única temperatura pertinente a efectos fisiológicos (37 $^{o}$C).

2. **DATOS**

Las cantidades de sustancia problema y de productos de su hidrólisis, en su caso, deben indicarse como porcentaje de la concentración inicial aplicada y, cuando corresponda, en mg/l respecto a cada intervalo de muestreo y cada pH y temperatura de ensayo. Además, debe darse un balance de masa en porcentaje de la concentración inicial aplicada cuando se haya utilizado una sustancia problema marcada.

Debe proporcionarse una representación gráfica del logaritmo de la concentración de la sustancia problema frente al tiempo. Deben identificarse todos los productos importantes de la hidrólisis, al menos los que constituyan una proporción > 10 % de la dosis aplicada, y sus concentraciones logarítmicas deben representarse de la misma manera que la sustancia original para mostrar sus velocidades de formación y destrucción.

▼B

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Utilizando cálculos según modelos cinéticos adecuados, deben obtenerse determinaciones más exactas de las semividas o valores de $TD_{50}$. Se consignarán los valores de semivida y $TD_{50}$ (incluidos los límites de confianza) respecto a cada pH y temperatura, junto con la descripción del modelo utilizado, el orden de la cinética y el coeficiente de determinación ($r^2$). Si procede, se aplicarán los cálculos asimismo a los productos de la hidrólisis.

Si se trata de estudios de velocidad efectuados a varias temperaturas, las constantes de velocidad de hidrólisis de pseudo-primer orden ($k_{obs}$) deberán describirse en función de la temperatura. Los cálculos se basarán tanto en la separación de $k_{obs}$ en constantes de velocidad en relación con la hidrólisis catalizada por ácidos, la neutra y la catalizada por bases (kH, kneutral y $k_{OH}$ respectivamente) como en la ecuación de Arrhenius:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

donde $A_i$ y $B_i$ son constantes de regresión de la ordenada en el origen y de la pendiente, respectivamente, de las rectas mejor ajustadas obtenidas por regresión lineal de ln $k_i$ frente a la inversa de la temperatura absoluta en grados Kelvin (T). Mediante el uso de las relaciones de Arrhenius respecto a la hidrólisis catalizada por ácidos, la neutra y la catalizada por bases, es posible calcular constantes de velocidad de pseudo-primer orden y, por tanto, semividas, relativas a otras temperaturas a las que sea difícil efectuar directamente la determinación experimental de una constante de velocidad (10).

2.2. EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La mayoría de las reacciones de hidrólisis muestran una velocidad de reacción de primer orden aparente y, por lo tanto, las semividas son independientes de la concentración (véase la ecuación 4 del anexo 2). Esto permite normalmente aplicar a condiciones ambientales (concentraciones < $10^{-6}$ M) los resultados de laboratorio determinados a concentraciones de $10^{-2}$ a $10^{-3}$ M (10). Mabey y Mill (11) han presentado varios ejemplos de concordancia entre velocidades de hidrólisis medidas en agua tanto pura como natural respecto a diversas sustancias, con la condición de que se hubieran medido tanto el pH como la temperatura.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la posición del marcador si se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés (véase el punto 1.5),

— pureza (impurezas) de la sustancia problema,

— pureza radioquímica de la sustancia marcada y actividad molar (si procede).

▼B

— Soluciones amortiguadoras:

— fechas y datos de su preparación,

— amortiguadores y aguas utilizados,

— molaridad y pH de las soluciones amortiguadoras.

Condiciones de ensayo:

— fechas de realización de los estudios,

— cantidad de la sustancia problema aplicada,

— métodos y disolventes (tipo y cantidad) utilizados para la aplicación de la sustancia problema,

— volumen incubado de las soluciones amortiguadoras con la sustancia problema,

— descripción del sistema de incubación utilizado,

— pH y temperatura durante el estudio,

— tiempos de muestreo,

— métodos de extracción,

— métodos de identificación y cuantificación de la sustancia problema y de los productos de su hidrólisis en las soluciones amortiguadoras,

— número de réplicas en paralelo.

Resultados:

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,

— tasas de recuperación (en el punto 1.7.1 se dan los porcentajes necesarios para la validez del estudio),

— datos de las réplicas en paralelo y medias en forma tabular,

— balance de masa durante los estudios y al final de estos (si se utilizan sustancias problema marcadas),

— resultados del ensayo preliminar,

— evaluación e interpretación de los resultados,

— todos los datos y figuras originales.

La siguiente información es necesaria solo en caso de que se determine la velocidad de hidrólisis:

— representación gráfica de la concentración frente al tiempo correspondiente a las sustancias problema y, en su caso, a los productos de la hidrólisis a cada valor de pH y temperatura,

— cuadros de resultados de la ecuación de Arrhenius para la temperatura de 20 - 25 $^{o}$C, con los valores de pH, constante de velocidad [$h^{-1}$ o $día^{-1}$], semivida o $TD_{50}$, temperaturas [ $^{o}$C], incluidos los límites de confianza y coeficientes de correlación ($r^2$) u otra información comparable,

— ruta propuesta de hidrólisis.

▼B

4. **REFERENCIAS**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) Unión Europea (UE) (1995). Directiva 95/36/CE de la Comisión, por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios. anexo V: Destino y comportamiento en el medio ambiente.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

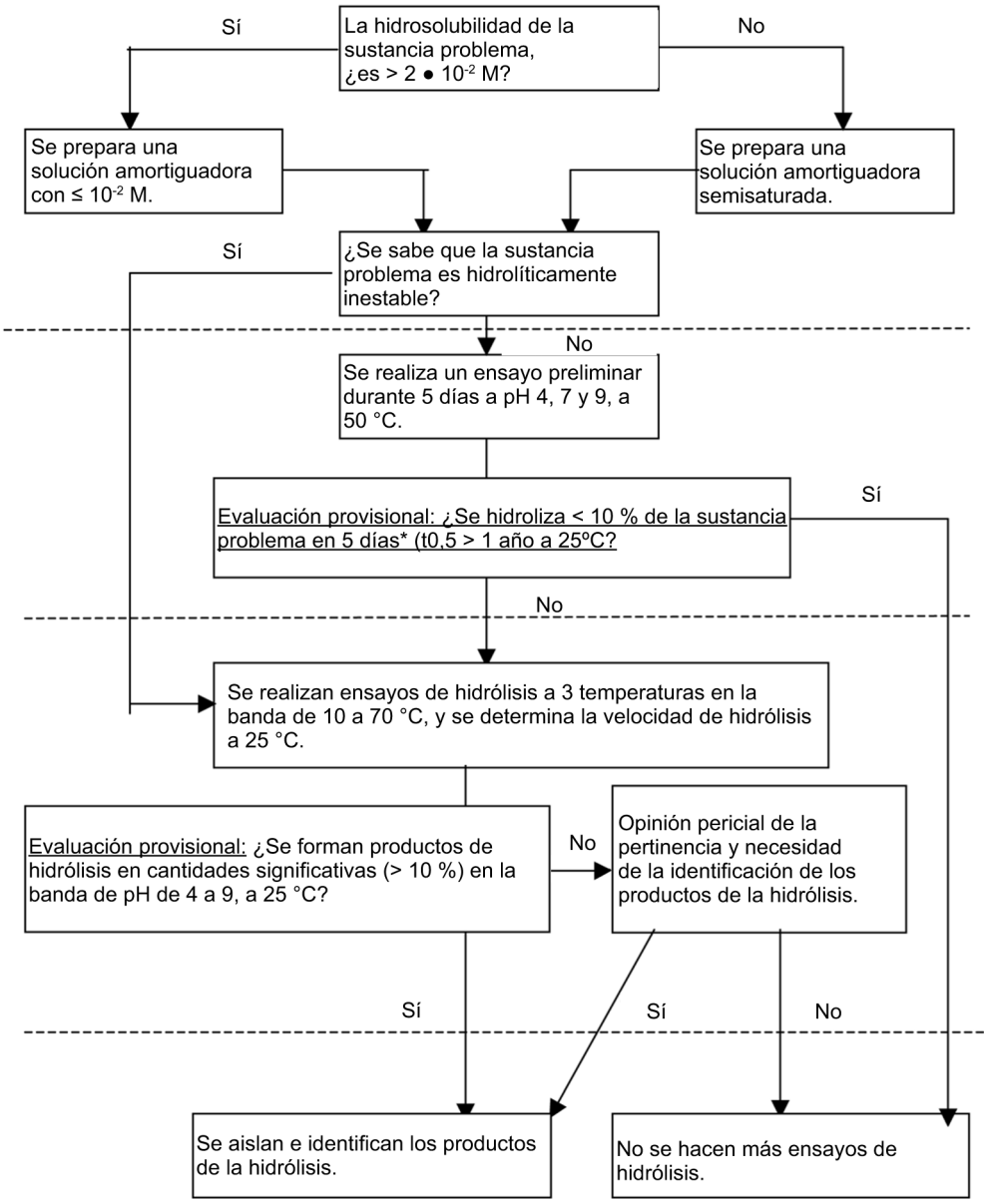
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383-415.

▼B

*Anexo 1*

**Esquema del ensayo de hidrólisis en etapas**




* El 10 % de hidrólisis de una sustancia problema a 50 °C equivale a una semivida de 30 días aproximadamente, lo que corresponde a un valor aproximado de un año a 25 ºC.

▼B

*Anexo 2*

**Definiciones y unidades**

Siempre deben utilizarse **unidades del Sistema Internacional**.

**Sustancia problema:** cualquier sustancia, sea el compuesto original o los correspondientes productos de transformación.

**Productos de transformación:** todas las sustancias procedentes de reacciones de transformación biótica o abiótica de la sustancia problema.

**Productos de hidrólisis:** todas las sustancias procedentes de reacciones de transformación hidrolítica de la sustancia problema.

**Hidrólisis:** reacción de una sustancia problema RX con el agua, con la sustitución final del grupo X por el OH en el centro de reacción:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

La velocidad a la que disminuye la concentración de RX en este proceso simplificado viene dada por:

velocidad = k $[H_2O]$ [RX] reacción de segundo orden

o

velocidad = k [RX] reacción de primer orden

según la fase determinante de la velocidad. Como hay un gran exceso de agua respecto a la sustancia problema, este tipo de reacción se suele describir como reacción de pseudo-primer orden, y la constante de velocidad observada viene dada por la fórmula siguiente:

$$k_{obs} = k\ [H_2O] \qquad [2]$$

and can be determined from the expression (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

donde

t = tiempo

y $C_o$, $C_t$ = concentraciones de RX a los tiempos 0 y t.

Las unidades de esta constante tienen las dimensiones de $(\text{tiempo})^{-1}$ y la semivida de la reacción (tiempo para que reaccione el 50 % de RX) viene dada por:

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

**Semivida:** ($t_{0,5}$) tiempo necesario para la hidrólisis del 50 % de una sustancia problema cuando puede describirse la reacción mediante una cinética de primer orden; es independiente de la concentración.

(*) Si la representación gráfica del logaritmo de los datos frente al tiempo no indica una función lineal (identificada con una velocidad de reacción de primer orden), no es apropiado utilizar la ecuación [3] para determinar la constante de la velocidad de hidrólisis de la sustancia problema.

▼B

**$TD_{50}$ (tiempo de desaparición 50):** tiempo necesario para que la concentración de la sustancia problema se reduzca en un 50 %; es diferente de la semivida ($t_{0,5}$) si la reacción no sigue una cinética de primer orden.

**Estimación de k a temperatura diferente**

Si se conocen las constantes de velocidad correspondientes a dos temperaturas, pueden calcularse las constantes de velocidad a otras temperaturas utilizando la ecuación de Arrhenius:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ o } \ln\ k = \frac{-E}{R \times T} + \ln\ A$$

La representación gráfica de ln k frente a l/T es una línea recta con una pendiente de -E/R

donde:

k = constante de velocidad, medida a temperaturas diferentes

E = energía de activación [kJ/mol]

T = temperatura absoluta [K]

R = R = constante de los gases [8,314 J/mol.K].

La energía de activación se calcula por análisis de regresión o con la siguiente ecuación:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

donde: $T_2 > T_1$.

▼B

*Anexo 3*

**Sistemas amortiguadores**

A. **CLARK Y LUBS:**

**Mezclas amortiguadoras de CLARK y LUBS (*)**

| Composición | pH |
|---|---|
| **HCl 0,2 N y KCl 0,2 N a 20 °C** | |
| 47,5 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml | 1,0 |
| 32,25 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml | 1,2 |
| 20,75 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml | 1,4 |
| 13,15 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml | 1,6 |
| 8,3 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml | 1,8 |
| 5,3 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml | 2,0 |
| 3,35 ml HCl + 25 ml KCl diluido hasta 100 ml | 2,2 |
| **Biftalato potásico 0,1 M + HCl 0,1 N a 20 °C** | |
| 46,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 2,2 |
| 39,60 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 2,4 |
| 32,95 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 2,6 |
| 26,42 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 2,8 |
| 20,32 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 3,0 |
| 14,70 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 3,2 |
| 9,90 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 3,4 |
| 5,97 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 3,6 |
| 2,63 ml HCl 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 3,8 |
| **Biftalato potásico 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C** | |
| 0,40 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 4,0 |
| 3,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 4,2 |
| 7,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 4,4 |
| 12,15 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 4,6 |
| 17,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 4,8 |

(*) Los valores de pH indicados en estos cuadros se han calculado a partir de mediciones del potencial utilizando las ecuaciones tipo de Sörensen (1909). Los valores correspondientes de pH son 0,04 unidades superiores a los valores de los cuadros.

▼B

| Composición | pH |
|---|---|
| 23,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 5,0 |
| 29,95 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 5,2 |
| 35,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 5,4 |
| 39,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 5,6 |
| 43,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 5,8 |
| 45,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml biftalato hasta 100 ml | 6,0 |

**Mezclas amortiguadoras de CLARK y LUBS (continuación)**

| **Fosfato monopotásico 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C** | |
|---|---|
| 5,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 6,0 |
| 8,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 6,2 |
| 12,60 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 6,4 |
| 17,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 6,6 |
| 23,45 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 6,8 |
| 29,63 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 7,0 |
| 35,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 7,2 |
| 39,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 7,4 |
| 42,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 7,6 |
| 45,20 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 7,8 |
| 46,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml fosfato hasta 100 ml | 8,0 |
| **$H_3BO_3$0,1 M en KCl 0,1 M + NaOH 0,1 N a 20 °C** | |
| 2,61 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 7,8 |
| 3,97 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 8,0 |
| 5,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 8,2 |
| 8,50 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 8,4 |
| 12,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 8,6 |
| 16,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 8,8 |
| 21,30 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 9,0 |
| 26,70 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 9,2 |

▼B

| | |
|---|---|
| 32,00 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 9,4 |
| 36,85 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 9,6 |
| 40,80 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 9,8 |
| 43,90 ml NaOH 0,1 N + 50 ml ácido bórico hasta 100 ml | 10,0 |

B. **KOLTHOFF Y VLEESCHHOUWER:**

**Amortiguadores de citrato de KOLTHOFF y VLEESCHHOUWER**

| Composición | pH |
|---|---|
| **Citrato monopotásico 0,1 M y HCl 0,1 N a 18 °C (*)** | |
| 49,7 ml. HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 2,2 |
| 43,4 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 2,4 |
| 36,8 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 2,6 |
| 30,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 2,8 |
| 23,6 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 3,0 |
| 17,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 3,2 |
| 10,7 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 3,4 |
| 4,2 ml HCl 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 3,6 |
| **Citrato monopotásico 0,1 M y NaOH 0,1 N a 18 °C (*)** | |
| 2,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 3,8 |
| 9,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 4,0 |
| 16,3 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 4,2 |
| 23,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 4,4 |
| 31,5 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 4,6 |
| 39,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 4,8 |
| 46,7 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 5,0 |
| 54,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 5,2 |
| 61,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 5,4 |
| 68,0 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 5,6 |
| 74,4 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 5,8 |
| 81,2 ml NaOH 0,1 N + 50 ml citrato hasta 100 ml | 6,0 |

(*) Se añaden pequeños cristales de timol u otra sustancia similar para evitar el crecimiento de mohos.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

**Mezclas de borato de SÖRENSEN**

| Composición | | Sörensen 18 °C | Walbum, pH a | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ml de bórax | ml HCl/NaOH | | 10 °C | 40 °C | 70 °C |
| **Bórax 0,05 M + HCl 0,1 N** | | | | | |
| 5,25 | 4,75 | 7,62 | 7,64 | 7,55 | 7,47 |
| 5,50 | 4,50 | 7,94 | 7,98 | 7,86 | 7,76 |
| 5,75 | 4,25 | 8,14 | 8,17 | 8,06 | 7,95 |
| 6,00 | 4,00 | 8,29 | 8,32 | 8,19 | 8,08 |
| 6,50 | 3,50 | 8,51 | 8,54 | 8,40 | 8,28 |
| 7,00 | 3,00 | 8,08 | 8,72 | 8,56 | 8,40 |
| 7,50 | 2,50 | 8,80 | 8,84 | 8,67 | 8,50 |
| 8,00 | 2,00 | 8,91 | 8,96 | 8,77 | 8,59 |
| 8,50 | 1,50 | 9,01 | 9,06 | 8,86 | 8,67 |
| 9,00 | 1,00 | 9,09 | 9,14 | 8,94 | 8,74 |
| 9,50 | 0,50 | 9,17 | 9,22 | 9,01 | 8,80 |
| 10,00 | 0,00 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| **Bórax 0,05 M + NaOH 0,1 N** | | | | | |
| 10,0 | 0,0 | 9,24 | 9,30 | 9,08 | 8,86 |
| 9,0 | 1,0 | 9,36 | 9,42 | 9,18 | 8,94 |
| 8,0 | 2,0 | 9,50 | 9,57 | 9,30 | 9,02 |
| 7,0 | 3,0 | 9,68 | 9,76 | 9,44 | 9,12 |
| 6,0 | 4,0 | 9,97 | 10,06 | 9,67 | 9,28 |

**Mezclas de fosfato de SÖRENSEN**

| Composición | pH |
|---|---|
| **Fosfato monopotásico 0,0667 M + fosfato disódico 0,0667 M a 20 °C** | |
| 99,2 ml $KH_2PO_4$ + 0,8 ml $Na_2HPO_4$ | 5,0 |
| 98,4 ml $KH_2PO_4$ + 1,6 ml $Na_2HPO_4$ | 5,2 |
| 97,3 ml $KH_2PO_4$ + 2,7 ml $Na_2HPO_4$ | 5,4 |
| 95,5 ml $KH_2PO_4$ + 4,5 ml $Na_2HPO_4$ | 5,6 |
| 92,8 ml $KH_2PO_4$ + 7,2 ml $Na_2HPO_4$ | 5,8 |
| 88,9 ml $KH_2PO_4$ + 11,1 ml $Na_2HPO_4$ | 6,0 |
| 83,0 ml $KH_2PO_4$ + 17,0 ml $Na_2HPO_4$ | 6,2 |
| 75,4 ml $KH_2PO_4$ + 24,6 ml $Na_2HPO_4$ | 6,4 |
| 65,3 ml $KH_2PO_4$ + 34,7 ml $Na_2HPO_4$ | 6,6 |

▼B

| | |
|---|---|
| 53,4 ml $KH_2PO_4$ + 46,6 ml $Na_2HPO_4$ | 6,8 |
| 41,3 ml $KH_2PO_4$ + 58,7 ml $Na_2HPO_4$ | 7,0 |
| 29,6 ml $KH_2PO_4$ + 70,4 ml $Na_2HPO_4$ | 7,2 |
| 19,7 ml $KH_2PO_4$ + 80,3 ml $Na_2HPO_4$ | 7,4 |
| 12,8 ml $KH_2PO_4$ + 87,2 ml $Na_2HPO_4$ | 7,6 |
| 7,4 ml $KH_2PO_4$ + 92,6 ml $Na_2HPO_4$ | 7,8 |
| 3,7 ml $KH_2PO_4$ + 96,3 ml $Na_2HPO_4$ | 8,0 |

▼B

C.8 **TOXICIDAD PARA GUSANOS DE TIERRA-ENSAYO**

CON SUELO ARTIFICIAL

1. **MÉTODO.**

1.1. INTRODUCCIÓN

En este ensayo de laboratorio, la sustancia con la que se va a experimentar se añade a un suelo artificial en el que se colocan gusanos durante 14 días, Después de este período (que, opcionalmente, puede ser de 7 días) se examina el efecto letal de la sustancia sobre los gusanos. Este ensayo provee un método que permite investigar, a relativamente corto plazo, los efectos causados por sustancias químicas sobre los gusanos, por absorción oral o cutánea.

1.2. DEFINICIÓN Y UNIDADES

$CL_{50}$: Concentración de una sustancia que se considera la causante de la muerte del 50 % de los animales investigados durante el período de ensayo.

1.3. SUSTANCIA DE REFERENCIA

Se utiliza periódicamente una sustancia de referencia como medio para demostrar que la sensibilidad del sistema de ensayo no ha cambiado de manera significativa.

Se recomienda que esta sustancia sea la cloroacetamida de grado analítico.

1.4. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Por ser el suelo un medio variable, para este ensayo se utiliza marga artificial definida cuidadosamente. Los gusanos adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota del anexo) se mantienen en una tierra artificial que se trata con diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo. El contenido de los recipientes se extiende sobre una bandeja a los 14 días (opcionalmente, pueden ser 7) del comienzo del ensayo y se cuenten los gusanos supervivientes para cada concentración.

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

El ensayo se proyecta de forma que sea lo más reproducible posible con respecto al sustrato y al organismo de ensayo. La mortalidad en los controles no debe exceder del 10 % al final del ensayo, o de lo contrario este no es válido.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. *Materiales*

1.6.1.1. Sustrato de ensayo

Como sustrato básico de ensayo usa un suelo artificial definido.

a) Sustrato básico (los porcentajes se expresan en términos de peso en seco:

— 10 % de turba esfágnea (con un pH lo más cercano posible a 5,5-6,0, sin restos visibles de plantas y finamente molida),

▼B

— 20 % de arcilla de caolinita, preferiblemente con más de un 50 % de caolinita

— alrededor del 69 % de arena de cuarzo industrial (predominando la arena fina, en la que más del 50 % de sus partículas sean de un tamaño de 0,05 a 0,2 mm). Si la sustancia no es lo suficientemente dispersable en agua, se deberán mantener disponibles 10 g por cada recipiente de ensayo para mezclarlos con la sustancia de ensayo más adelante,

— alrededor de un 1 % de carbonato calcico ($CO_2Ca$), pulverizado y químicamente puro, que se añade con el fin de que el valor del pH sea de 6,0 ± 0,5.

b) Sustrato de ensayo:

El sustrato de ensayo contiene el sustrato básico, la sustancia de ensayo y agua desionizada.

El contenido de agua oscila entre el 25 y el 42 % del peso en seco del sustrato básico. El contenido de agua de un sustrato se determina secando una muestra a una temperatura de 105 °C, hasta alcanzar un peso constante. El criterio clave consiste en humedecer la tierra artificial hasta un punto en que no quede agua estancada. Se debe tener cuidado al hacer la mezcla, de manera que se obtenga una distribución uniforme de la sustancia de ensayo y del sustrato. Deberá registrarse la manera en que se introduce la sustancia de ensayo en el sustrato.

c) Sustrato de control:

El sustrato de control contiene el sustrato básico y agua. Si se usa un agente aditivo, el sustrato de control adicional debe contener la misma cantidad de agente aditivo.

1.6.1.2. Recipientes de ensayo

Se utilizan recipientes de cristal (cubiertos adecuadamente con membranas, tapaderas o película de plástico con agujeros de ventilación) aproximadamente de un litro de capacidad y llenos de una cantidad de sustrato de ensayo húmedo o de control que sea equivalente a un peso en seco de 500 g de sustrato.

1.6.2. *Condiciones del ensayo*

Los recipientes se deberán mantener en cámaras climatizadas, a una temperatura de 20 (± 2)° C, con luz continua. La intensidad de la luz será de 400 a 800 lux.

El período de ensayo dura 14 días, aunque, opcíonalmente, se puede evaluar la mortalidad a los 7 días del comienzo del ensayo.

1.6.3. *Procedimiento de ensayo*

Concentraciones del ensayo

Las concentraciones de la sustancia de ensayo se expresan en peso de sustancia por peso en seco de sustrato básico (mg/kg).

Ensayo para determinar la gama de concentraciones

Por medio de este ensayo se determina la gama de concentraciones que ocasiona porcentajes de mortalidad de 0 a 100; con esta información se establece la gama de concentraciones que se vaya a utilizar en el ensayo definitivo.

▼B

La sustancia se estudiará a las siguientes concentraciones: 1 000, 100, 10, 1, 0,1 mg de sustancia/kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

Cuando vaya a realizarse un ensayo definitivo, bastará con un lote de ensayo para cada concentración y otro para el sustrato de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos, para llevar a cabo el ensayo de determinación de la gama de concentraciones.

Ensayo definitivo

Los resultados del ensayo para determinar la gama de concentraciones se usan para elegir cinco concentraciones como mínimo, en serie geométrica, que abarquen la gama de mortalidad del cero al 100 % y que difieran entre sí en un factor constante que no exceda de 1,8.

En los ensayos en que se utilice esta serie de concentraciones se estimará el valor de $CL_{50}$ y de sus límites de confianza de la manera más precisa posible.

En el ensayo definitivo se utilizan, como mínimo, cuatro lotes de ensayo por concentración y cuatro sustratos de control sin tratar, cada uno de ellos con diez gusanos. Los resultados de estos lotes reproducidos son la media y la desviación típica.

Cuando de dos concentraciones consecutivas, en una proporción de 1,8, solo se obtienen los porcentajes de mortalidad de 0 % y 100 %, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de $CL_{50}$.

Mezcla del sustrato de ensayo básico y de la sustancia de ensayo

Siempre que sea posible, el sustrato de ensayo no deberá estar compuesto de ningún otro agente adicional que no sea agua. Inmediatamente antes del comienzo del ensayo, se mezcla una emulsión o dispersión de la sustancia de ensayo en agua desionizada disolvente con el sustrato de ensayo básico, o se rocía dicha emulsión sobre éste de manera uniforme con un rociador cromatográfico fino o con un aparato similar.

Si la sustancia de ensayo no es soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo).

Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia de ensayo solo pueden utilizarse los agentes que se volatilizan rápidamente. El sustrato de ensayo debe ser ventilado antes de usarlo. Se repondrá la cantidad de agua evaporada. El sustrato de control deberá contener la misma cantidad de agente aditivo.

Si la sustancia de ensayo no fuese soluble, dispersable o emulsionable en disolventes orgánicos, se mezclarán 10 g de una mezcla de arena de cuarzo finamente molido y la cantidad necesaria de sustancia de ensayo para tratar 500 g (peso en seco) de suelo artificial, con 490 g (peso en seco) de sustrato de ensayo.

Por cada lote de ensayo, se coloca en cada recipiente de cristal una cantidad de sustrato de ensayo húmedo equivalente a 500 g de peso en seco, y en la superficie del mismo se colocan diez gusanos, que han sido acondicionados durante 24 horas en un sustrato básico húmedo similar y a los que, después de lavarlos rápidamente, se les ha extraído el exceso de agua con papel de filtro antes de usarlos.

▼B

Los recipientes se cubren con tapas de plástico perforado, platos o película para evitar el secado del sustrato, y se guardan bajo las condiciones de ensayo durante 14 días.

Se evaluarán los resultados después de 14 días (u opcionalmente, después de 7 días) del comienzo del ensayo. El sustrato se extiende en una placa de vidrio o de acero inoxidable. Se examinan los gusanos y se determina el número de supervivientes. Los gusanos te consideran muertos si no responden a un suave estímulo mecánico en la parte frontal de su cuerpo.

Cuando el examen se efectúa a los 7 días, el recipiente se vuelve a llenar con el sustrato y los gusanos supervivientes se colocan otra vez en la superficie del mismo.

1.6.4. *Organismos de ensayo*

Los organismos de ensayo deberán ser adultos de la especie *Eisenia foetida* (véase la nota en el anexo) (como mínimo con dos meses de edad y con clitelo) y de un peso húmedo de 300 a 600 mg (véase el anexo para el método de reproducción).

2. **DATOS**

2.1. TRATAMIENTO Y EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS

Las concentraciones de la sustancia ensayada se registran con referencia a los porcentajes correspondientes de gusanos de tierra muertos.

Cuando los datos son adecuados, el valor de $CL_{50}$ y los límites de fiabilidad($p = 0,05$) se determinan por medio de métodos estándar (como el de Litchfield y Wilcoxon, 1949, o un método equivalente). El valor de $CL_{50}$ debe ser expresado en mg de sustancia de ensayo por kg de sustrato de ensayo (peso en seco).

En los casos en que la pendiente de la curva de concentración es tan pronunciada que no puede calcularse el valor de $CL_{50}$, se considera suficiente una estimación gráfica de este valor.

Cuando de dos concentraciones consecutivas en una proporción de 1,8 solo se obtienen porcentajes de mortalidad de 0 % y 100 %, estos dos valores son suficientes para indicar la gama en la que se encuentra el valor de $CL_{50}$.

3. **INFORMES**

3.1. INFORME DEL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con los criterios de calidad mencionados anteriormente,

— tipo de ensayo efectuado (ensayo de determinación de la gama de concentraciones y/o ensayo definitivo),

— descripción exacta de las condiciones del ensayo o declaración en la que conste que el ensayo se ha efectuado de conformidad con el método; se informará de cualesquiera diferencias con respecto a dicho método,

— descripción exacta de la manera en que se ha mezclado la sustancia de ensayo con el sustrato de ensayo básico,

— información acerca de los organismos de ensayo (especie, edad, peso medio y gama de variación, condiciones relativas a reproducción y cría, abastecedor),

▼B

— método usado en la determinación del valor de $CL_{50,}$

— resultados del ensayo, incluidos todos los datos utilizados,

— descripción de los síntomas o de los cambios en el comportamiento de los organismos de ensayo que se hayan observado,

— mortalidad en los sustratos de control,

— valor de $CL_{50}$ o la máxima concentración con mortalidad y la mínima con una mortalidad del 100 %, después de 14 días (y opcionalmente después de siete días) del comienzo del ensayo,

— trazado de la curva de concentración — respuesta,

— resultados obtenidos con la sustancia de referencia, ya sea en relación con el ensayo actual o con ejercicios previos de control de calidad.

4. **REFERENCIAS**

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas* 207. Decisión del Consejo C(81) 30 final.

(2) Edwards, D. A. and Lofty, J. R., 1977. *Biology of Earthworms.* London: Chapman and Hall, 331 pp.

(3) Bouche, M. B. 1972. *Lombriciens de France, Ecologie et Systematique.* Publ. Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., 1949. A simpliefied method of evaluating dose-effect experiments.J. *Pharm. Exp. Therap., 96,* 99-113.

(5) CEE 1983. *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxictty of chemical substances to earthworms*. Report EUR 8714 EN.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrens vorschlag «Toxizitätstest am Regenwurm Eisern a foetid a in künstlichem Boden», in: Rudolph/Boje: Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

*Apéndice*

**Reproducción y cría de los gusanos con anterioridad at ensayo**

A fines de reproducción, se colocan en una caja de cría con sustrato fresco de 30 a 50 gusanos adultos, y se sacan después de 14 días. Estos animales se pueden utilizar para lotes de reproducción adicionales. Los gusanos nacidos de los capullos se utilizan en los ensayos una vez que han alcanzado la madurez (según las condiciones prescritas, después de 2 a 4 meses).

**Condiciones de reproducción y cría**

| | |
|---|---|
| Cámara climatizada: | a una temperatura de 20 (± 2)$^{o}$ C, preferiblemente con luz continua (intensidad de 400 a 800 lux). |
| Cajas de reproducción: | recipientes poco profundos apropiados, con un volumen de 10 a 20 litros. |
| Sustrato: | *Eisenia foetida:* Se puede criar en los excrementos de varios animales. Como medio de crianza se recomienda utilizar una mezcla con un 50 % en volumen de turba y el otro 50 % de excrementos de vaca o caballo. Este medio debe tener un valor aproximado de pH entre 6 y 7 (regulado con carbonato cálcico) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mmhos o una concentración de sal del 0,5 %).<br><br>El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado.<br><br>Además del método expuesto anteriormente, se pueden utilizar otros procedimientos con éxito. |

*Nota:* Existen dos razas de *Eisenia foetida,* que algunos taxonomistas han subdividido en especies (Bouche, 1972). Estas dos razas son morfológicamente similares, aunque una de ellas, la *Eisenia foetida foetida,* exhibe rayas o bandas transversales típicas en los segmentos, mientras que a la otra, la *Eisenia foetida andrei,* de color rojizo jaspeado, le faltan. Siempre que sea posible se utilizará la *Eisenia foetida andrei.* Se pueden utilizar otras especies, siempre que se disponga de la metodología necesaria.

▼B

C.9. **BIODEGRADACIÓN**

PRUEBA ZAHNWELLENS

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

El objeto de este método es la evaluación de la máxima degradación potencial de sustancias orgánicas solubles en agua y no volátiles, cuando se encuentran expuestas a concentraciones relativamente elevadas de microorganismos en un ensayo estático.

Puede producirse una absorción físico-química sobre los sólidos en suspensión y esto hay que tenerlo en cuenta a la hora de interpretar los resultados (véase el punto 3.2).

Las sustancias que vayan a estudiarse serán utilizadas en concentraciones equivalentes a valores de COD entre los 50 y 400 mg/litro o valores de DQO entre los 100 y 1 000 mg/litro(COD = carbón orgánico disuelto; DQO = demanda química de oxígeno). Estas concentraciones relativamente elevadas tienen la ventaja de ser analíticamente fiables. Los compuestos con propiedades tóxicas pueden retardar o inhibir el proceso de degradación.

En este método, la medida de la concentración de carbón orgánico disuelto, o la demanda de oxígeno químico, se utiliza para calcular la biodegradación máxima de la sustancia objeto del ensayo.

La utilización simultánea de un método analítico específico puede permitir calcular la biodegradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

Este método es aplicable solamente a aquellas sustancias orgánicas que, a la concentración utilizada en el ensayo:

— sean solubles en agua en las condiciones del ensayo,

— tengan una presión de vapor insignificante en las condiciones del ensayo,

— no provoquen inhibición en las bacterias,

— sean absorbidas dentro del sistema del ensayo solo hasta un cierto punto limitado,

— no se pierdan a causa de la formación de espuma a partir de la. solución del ensayo.

La información sobre las proporciones relativas de los principales componentes del material del ensayo será necesaria para la interpretación de los resultados obtenidos, particularmente en los casos en que los resultados sean reducidos o marginales.

La información sobre la toxicidad de la sustancia para los microorganismos resulta conveniente para la interpretación de resultados reducidos y para la selección de las concentraciones apropiadas para el ensayo.

▼B

1.2. DEFINICIONES Y UNIDADES

La cantidad de degradación alcanzada al final del ensayo se presenta como la biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens:

$$D_T(\%) = \left[1 - \frac{C_T - C_V}{C_D - C_{VD}}\right] \times 100$$

donde:

$D_T$ = biodegradación (%) en el tiempo T

$C_D$ = valores de COD (o DQO) en la mezcla del ensayo medidos tres horas después del comienzo del mismo (mg/l) (COD = Carbón orgánico disueleo; DQO = demanda química de oxígeno)

$C_T$ = valores de COD o DQO e la mezcla del ensayo en el momento en que se toma la muestra (mg/l)

$C_V$ = valores de COD o DQO del blanco en el momento de la toma de la muestra (mg/l)

$C_{Vd}$ = valores de COD y DQO en el blanco, medidos 3 horas después del comienzo de la prueba (mg/l).

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana.

El porcentaje de degradación se expresa como el porcentaje de supresión de COD (o DQO) de la sustancia objeto del ensayo.

La diferencia entre los valores medidos tras 3 horas y el valor inical calculado, o preferiblemente medido, puede proporcionar una información útil sobre la eliminación de la sustancia (véase el punto 3.2, «Interpretación de los resultados»).

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

En algunos casos, cuando se están investigando sustancias nuevas, las sustancias de referencia pueden resultar útiles; no obstante, todavía no se pueden recomendar sustancias de referencia específicas.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se ponen juntos, en un recipiente de vidrio de 1 a 4 litros de capacidad y equipado con un mezclador y un aireador, lodo activado, nutrientes minerales y et material del ensayo como única fuente de carbón en solución acuosa. Se remueve y se airea la mezcla a 20-25 °C, bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro por un período de hasta 28 días. El proceso de degradación se controla por medio de la determinación de los valores de COD (o DQO) en la solución filtrada a intervalos diarios o a intervalos regulares que resulten apropiados. La relación entre la cantidad de COD (DQO) eliminada tras cada intervalo y el valor 3 horas después del comienzo, se expresa en forma de porcentaje de biodegradación y sirve de medida del alcance de la degradación en ese momento. El resultado se indica en un gráfico en función del tiempo para obtener así la curva de biodegradación.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria),

▼B

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

Ha quedado demostrado que la reproducibilidad de esta prueba es satisfactoria en una prueba en varios centros.

La sensibilidad de este método viene determinada en gran medida por la variabilidad del blanco y, en menor medida, por la precisión de la determinación del carbón orgánico disuelto y el nivel del compuesto del ensayo en Ja mezcla liquida.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1.6.1. *Preparativos*

1.6.1.1. Reactivos

Agua de ensayo: agua potable con un cotenido de carbón orgánico menor de 5 mg/l. La concentración de iones de calcio y magnesio juntos no puede exceder los 2,7 mmoles/l; de otra manera, es necesaria una dilución suficiente con agua desionizada o destilada.

| | |
|---|---|
| Ácido sulfúrico, reactivo analítico (R.A.): | 50 g/l |
| Solución de hidróxído de sodio R.A.: | 40 g/l |

Solución de nutriente mineral: disuélvase en un litro de agua desionizada:

| | |
|---|---|
| cloruro de amonio, $NH_4Cl$, R.A.: | 38,5 g |
| dihidrógeno fosfato de sodio, $NaH_2PO_4$,. $2H_2O$, R.A.: | 33,4 g |
| dihidrógeno fosfato de potasio, $KH_2PO_4$, R.A.: | 8,5 g |
| monohidrógeno fosfato de dipotasio, $K_2HPO_4$, R.A.: | 21,75 g. |

La mezcla sirve a la vez de elemento nutritivo y de sistema tampón.

1.6.1.2. Aparatos

Recipientes de vidrio de un volumen de 1 a 4 litros (por ejemplo, recipientes cilindricos).

Mezclador con un agitador de vidrio o metal colocado en un eje apropiado. (El agitador debe girar a 5-10 cm por encima del fondo del recipiente). Se puede utilizar en su lugar un agitador magnético con una varilla de 7-10 cm de larga.

Un tubo de vidrio de 2 a 4 mm de diámetro interior para introducir aire. La abertura del tubo debe estar a, más o menos, 1 cm por encima del fondo del recipiente.

Una centrífuga (unos 3 550 g).

Un medidor de pH.

Un medidor de oxígeno disuelto.

Filtros de papel.

▼B

Un aparato de filtración por membrana.

Filtros de membrana, tamaño de los poros 0,45 um. Los filtros de membrana son apropiados si es seguro que ni desprenden carbón ni absorben la sustancia en la fase de filtración.

Un equipo analítico para determinar el contenido de carbón orgánico y la demanda química de oxígeno.

1.6.1.3. Preparación del inóculo

Se lava (repetidamente) el lodo activado recogido en una planta de tratamiento biológico, centrifugándolo o dejándolo sedimentarse con agua de iguales características a la que se usa para el ensayo (antes citado).

El lodo activado tiene que estar en condiciones adecuadas. Este fango puede encontrarse en una planta depuradora de aguas residuales que funcione debidamente. Para coger tantas especies o cepas de bacterias diferentes como sea posible, puede ser preferible mezclar inóculos de diferentes fuentes (por ejemplo, diferentes plantas depuradoras, extractos de suelos, aguas de río, etc.). La mezcla debe ser tratada como se describe anteriormente.

Para comprobar la actividad del lodo activado, véase «Control funcional».

1.6.1.4. Preparación de las soluciones del ensayo

Pónganse, en el recipiente que se utiliza para el ensayo, 500 ml de agua de ensayo, 2,5 ml/l de una solución de nutrientes minerales y lodo activado en una cantidad equivalente a 0,2 a 1,0 g/l de materia seca en la mezcla final. Añádase suficiente solución madre de la sustancia a ensayar como para que en la mezcla final se obtenga una concentración de COD de 50 a 400 mg/l. Los valores correspondientes de DQO son 100-1 000 mg/l. Añádase agua de ensayo hasta llegar a un volumen total de 1 a 4 litros. El volumen toral que se elija dependerá del número de muestras que se vayan a tomar para las determinaciones del COD y DQO y las cantidades necesarias para el procedimiento analítico.

Normalmente, puede considerarse satisfactorio un volumen de 2 litros. Se dispone por lo menos un recipiente de control (blanco), paralelamente a cada una de las series de ensayo, que contenga tan solo una solución de lodo activado y la solución de nutrientes minerales, que se completará con agua de ensayo hasta alcanzar un volumen total igual al de los recipientes de ensayo.

1.6.2. *Realización del ensayo*

Se agitan los recipientes del ensayo con agitadores magnéticos o hélices bajo una iluminación difusa o en un cuarto oscuro a 20-25° C. La aireación se efectúa con aire comprimido limpiado por medio de un filtro de algodón y lana y un frasco lavador si fuera necesario. Hay que asegurarse de que el lodo no sedimenta y de que la concentración de oxígeno no cae por debajo de los 2 mg/l.

Hay que controlar el pH a intervalos regulares (por ejemplo, cada día) y, si fuera necesario, corregirlo ajustándolo a 7-8.

▼B

Las pérdidas por evaporación se compensan, justo antes de tomar cada muestra, con agua desionizada o destilada en las cantidades necesarias. Un buen procedimiento es marcar el nivel del líquido sobre el recipiente antes de iniciar el ensayo. Se harán marcas nuevas después de cada toma (sin aireación y sín remover). Las primeras muestras se toman siempre 3 horas después del comienzo del ensayo, para detectar la absorción del material de ensayó por parte del lodo activado.

La eliminación del material de ensayo se controla por medio de las determinaciones de COD y DQO hechas diariamente o a intervalos regulares. Las muestras del recipiente utilizado para el ensayo y del recipiente de control son filtradas con un filtro de papel cuidadosamente lavado. Se desechan los primeros 5 ml de la solución filtrada. Los lodos dificiles de filtrar pueden ser separados previamente centrifugándolos durante 10 minutos. Las determinaciones de COD y DQO deben hacerse por lo menos por duplicado. El ensayo se lleva a cabo durante un período de hasta 28 días.

*Nota:* Las muestras que todavía estén turbias son filtradas con filtros de membrana. Los filtros de membrana no han de desprender ni absorber material orgánico alguno.

Control funcional del lodo activado

En un recipiente que contenga una sustancia conocida deben llevarse a cabo paralelamente cada serie de pruebas, con vistas a controlar la capacidad funcional del lodo activado. Se ha comprobado que el dietilcnoglicol es de utilidad para este propósito.

Adaptación

Si los análisis se llevan a cabo a intervalos relativamente cortos (por ejemplo, diariamente), se puede reconocer claramente la adaptación por medio de la curva de degradación (véase la figura 2). Así pues, el ensayo no debe iniciarse justo antes del fin de semana.

Si la adaptación tiene lugar al final del período, el ensayo puede prolongarse hasta que finalice la degradación.

*Nota:* Si fuera necesario un conocimiento más amplio del comportamiento del lodo adaptado, se expone de nuevo el mismo lodo activado al mismo material del ensayo, de acuerdo con el siguiente procedimiento:

Desconéctense el agitador y el aireador y permítase que el lodo activado se sedimente. Vacíese el líquido sobrenadante, añádase agua de ensayo hasta alcanzar los 2 litros, agítese durante 15 minutos y déjese sedimentar de nuevo. Después de haber vaciado de nuevo el líquido sobrenadante, utilícese el lodo que queda para repetir el ensayo con el mismo material, de acuerdo con los puntos 1.6.1.4 y 1.6.2. Se puede aislar el lodo activado centrifugando en vez de dejándolo sedimentar.

El lodo adaptado puede mezclarse con lodo fresco hasta alcanzar un total de 0,2 a 1 g de peso en seco, por litro.

▼B

Medios analíticos

Normalmente, se filtran las muestras con un filtro de papel cuidadosamente lavado (para lavarlo, utilícese agua desionizada).

Las muestras que sigan estando turbias se filtrarán con filtros de membrana (0,45 μm).

La concentración de COD se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado (se desechan los primeros 5 ml) por medio del instrumento TOC. Si el líquido filtrado no puede ser analizado el mismo día, tiene que almacenarse en el refrigerador hasta el día siguiente. No se recomienda un almacenaje más prolongado.

La concentración de DQO se determina por duplicado en las muestras de líquido filtrado con un sistema analítico siguiendo el procedimiento descrito en la referencia (2) posterior.

2. **DATOS Y EVALUACIÓN**

Las concentraciones de COD y DQO se determinan en las muestras, por lo menos por duplicado, de acuerdo con el punto 1.6.2. La degradación en el tiempo T se calcula según la fórmula (con definiciones) dada en el punto 1.2.

El alcance de la degradación se redondea hasta llegar a completar la unidad de porcentaje más cercana. La cantidad de degradación lograda al final del ensayo se presenta como la «biodegradabilidad en la prueba Zahn — Wellens».

*Nota:* Si se logra una degradación completa antes de que termine el período de duración del ensayo y si este resultado es confirmado por un segundo análisis al día siguiente, el ensayo puede darse por concluido.

3. **PRESENTACIÓN DEL INFORME**

3.1. INFORME SOBRE EL ENSAYO

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— la concentración inicial de la sustancia,

— cualquier otra información y los resultados experimentales relativos a la sustancia objeto del ensayo, a la sustancia de referencia, si se utiliza alguna, y al control,

— la concentración después de tres horas,

— la curva de biodegradación con una descripción,

— fecha y lugar en que se tomaron las muestras de los organismos utilizados en el ensayo, status de adaptación, concentración utilizada, etc.,

— causas científicas de cualquier cambio en el procedimiento del ensayo.

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La eliminación de COD (o DQO) que tiene lugar gradualmente, durante días o semanas, indica que la sustancia objeto del ensayo se está biodegradando.

▼B

No obstante, la absorción físico-química puede, en algunos casos, desempeñar un papel, y esto se pone de manifiesto cuando hay una eliminación completa o parcial desde el principio, dentro de las tres primeras horas, y la diferencia entre las mezclas líquidas sobrenadantes del control y del ensayo se mantienen a un nivel inesperadamente bajo.

Son necesarias pruebas adicionales si se quiere establecer una diferencia entre biodegradación (o biodegradación parcial) y absorción.

Esto puede hacerse de varias maneras, pero lo más conveniente es usar el sobrenadante como inóculo en un ensayo de base fija (una prueba respirométrica preferentemente).

Las sustancias que en este ensayo den una eliminación de COD (o DQO) alta, y no debida a la absorción, deben ser consideradas como potencialmente biodegradables. Una eliminación parcial y no debida a la absorción indica que el producto químico puede sufrir al menos cierta biodegradación. Una eliminación baja o nula de COD (o DQO) puede deberse a que la sustancia objeto del ensayo provoca la inhibición de los microorganismos. Esto puede asimismo ponerse de manifiesto a través de una desintegración y pérdida del lodo, produciendo sobrenadantes turbios. Se debe repetir el ensayo utilizando una concentración inferior de la sustancia objeto de estudio.

La utilización de un método analítico específico para el compuesto, o de una sustancia del ensayo marcada con $^{14}C$, puede permitir una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de ensayo marcado con $^{14}$ C la obtención de $^{14}CO_2$ confirmará que se ha producido biódegradación.

Cuando los resultados se presenten en términos de biodegradación primaria, se debe dar, si fuera posible, una explicación sobre el cambio de estructura química que lleva a la pérdida de respuesta de la sustancia madre utilizada en el ensayo.

La validación del método analítico tiene que presentarse junto con la respuesta encontrada con el medio de ensayo control (blanco).

**REFERENCIAS**

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas* 302 B. Decisión del Consejo C(81) 30 final.

(2) anexo V C.9 Degradación: Demanda química de oxígeno, Directiva 84/449/CEE de la Comisión, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* Nº L 251 de 19.9.1984.

▼B

*Anexo*

EJEMPLO DE EVALUACIÓN

| | |
|---|---|
| Compuesto orgánico: | Ácido 4-Etoxibenzoico |
| Concentración teórica de ensayo: | 600 mg/l |
| COD teórico: | 390 mg/l |
| inóculo: | Planta depuradora de aguas residuales . . . |
| Concentración: | 1 g de material seco/litro |
| Status de adaptación: | No adaptado |
| Análisis: | Determinación de COD |
| Cantidad de muestra: | 3 ml |
| Sustancia de control: | Dietilenglicol |
| Toxicidad del compuesta: | Sin efectos tóxicos por debajo de los 1 000 mg/l. Ensayo utilizado: Ensayo de fermentación con tubos. |

| Tiempo de ensayo | Sustancia de control | | | | Sustancia de ensayo | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | COD ([1]) del control mg/l | COD ([1]) mg/l | COD neto mg/l | Degradación % | COD ([1]) mg/l | COD neto mg/l | Degradación (%) |
| 0 | — | — | 300,0 | — | — | 390,0 | _ |
| 3h | 4,0 | 298,0 | 294,0 | 2 | 371,6 | 367,6 | 6 |
| 1 d | 6,1 | 288,3 | 282,2 | 6 | 373,3 | 367,2 | 6 |
| 2d | 5,0 | 281,2 | 276,2 | 8 | 360,0 | 355,0 | 9 |
| 5 d | 6,3 | 270,5 | 264,2 | 12 | 193,8 | 187,5 | 52 |
| 6d | 7,4 | 253,3 | 245,9 | 18 | 143,9 | 136,5 | 65 |
| 7d | 11,3 | 212,5 | 201,2 | 33 | 104,5 | 93,2 | 76 |
| 8 d | 7,8 | 142,5 | 134,7 | 55 | 58,9 | 51,1 | 87 |
| 9 d | 7,0 | 35,0 | 28,0 | 91 | 18,1 | 11,1 | 97 |
| 10 d | 18,0 | 37,0 | 19,0 | 94 | 20,0 | 2,0 | 99 |

([1]) Valores medios de determinaciones por triplicado.

▼B

*Figura 1*

**Ejemplos de curvas de biodegradación**

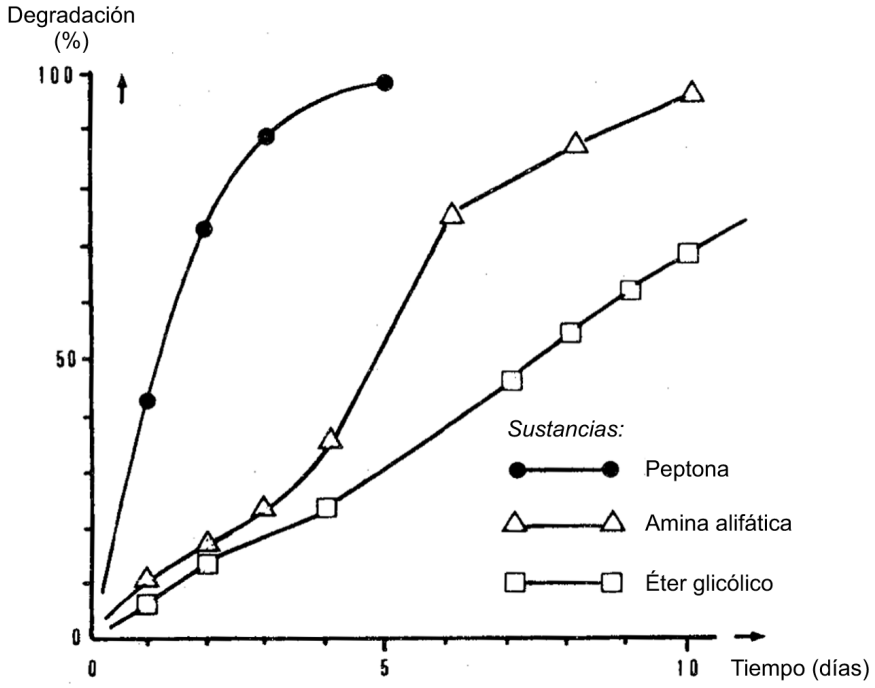
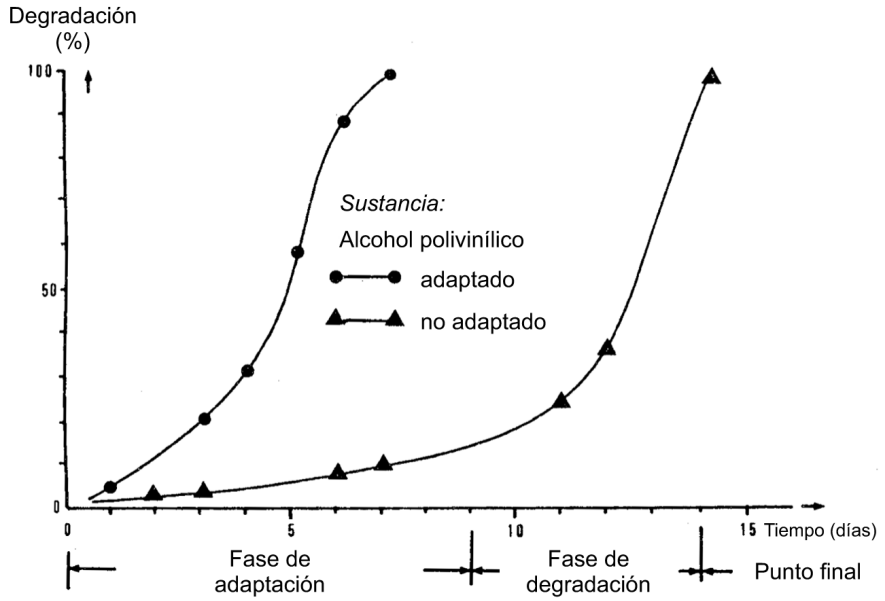



*Figura 2*

**Ejemplos de adaptación del lodo**



▼M4

## C.10. PRUEBA DE SIMULACIÓN DE TRATAMIENTO AERÓBICO DE AGUAS RESIDUALES: C.10-A: UNIDADES DE LODO ACTIVADO — C.10-B: BIOPELÍCULAS

### C.10-A: Unidades de lodo activado

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 303 (2001). En la década de 1950 se observó que los agentes tensioactivos de reciente introducción provocaban la formación excesiva de espuma en las depuradoras de aguas residuales y en los ríos. El tratamiento aeróbico no era suficiente para eliminarlos totalmente y en algunos casos limitaban la eliminación de otros tipos de materia orgánica. Esta situación dio pie a que se pusieran en marcha muchas investigaciones sobre cómo eliminar los agentes tensioactivos de las aguas residuales y sobre si las nuevas sustancias producidas por la industria podían someterse al tratamiento de las aguas residuales. Con este objetivo, se utilizaron unidades modelo que representaban a los dos tipos principales de tratamiento biológico aeróbico de las aguas residuales (lodo activado y filtración por percolación o por goteo). Habría sido poco práctico y muy caro distribuir cada sustancia nueva y controlar las grandes depuradoras, incluso de forma local.

CONSIDERACIONES INICIALES

**Unidades de lodo activado**

2. Se han descrito unidades modelo de lodo activado en una gama de 300 a unos 2 000 ml. Algunas simulaban muy bien las condiciones de las instalaciones de escala real, y disponían de tanques de sedimento de lodo en los que el lodo sedimentado se bombeaba de nuevo al tanque de aireación, mientras que otras no tenían dispositivos de sedimentación como, por ejemplo, Swisher (1). El tamaño del aparato representa un compromiso: por una parte, debe ser suficientemente grande para un funcionamiento mecánico adecuado y para permitir la toma de un volumen suficiente de muestras sin que el funcionamiento se vea afectado, pero, por otra parte, no debe ser tan grande que sus necesidades de espacio y de materiales sean excesivas.

3. Dos formas de aparatos que se han utilizado ampliamente y dando satisfacción son las unidades Husmann (2) y las unidades de depósito poroso (3) (4), que son las utilizadas en primer lugar en el estudio de tensioactivos; estas se describen en el presente método de ensayo. Hay otros tipos que también se han utilizado con éxito, como el de Eckenfelder (5). Debido a que son relativamente elevados el coste y el esfuerzo necesarios para aplicar esta prueba de simulación, se han investigado en paralelo otros ensayos exploratorios más simples y baratos, recogidos ahora en el capítulo C.4-A a F del presente anexo (6). La experiencia con muchos tensioactivos y otras sustancias ha puesto de manifiesto que los que pasaban los ensayos exploratorios (fácilmente biodegradables) también se degradaban en el ensayo de simulación. Algunos de los que no pasaban los ensayos exploratorios sí conseguían pasar los ensayos de biodegradabilidad intrínseca [capítulos C.12 (7) y C.19 (8) del presente anexo], pero solo algunos de este último grupo eran degradados en el ensayo de simulación, mientras que las sustancias que no pasaban los ensayos de biodegradabilidad intrínseca tampoco se degradaban en los ensayos de simulación (9) (10) (11).

4. Para algunos fines son suficientes los ensayos de simulación efectuados con un solo conjunto de condiciones de funcionamiento; los resultados se expresan en porcentaje de la eliminación de la sustancia problema o del carbono orgánico disuelto (COD). En el presente método de ensayo se describe un método de este tipo. Sin embargo, a diferencia de la versión anterior del presente capítulo, que describía un solo tipo de aparato para depurar agua residual sintética en el método de unidades acopladas utilizando un método relativamente sencillo de retirada de lodo, el presente

▼M4

texto ofrece una serie de variaciones. Se describen alternativas del tipo de aparato, del modo de funcionamiento y de eliminación de las aguas residuales y de retirada del lodo. El texto sigue de cerca el de la norma ISO 11733 (12), que fue objeto de mucha atención durante su preparación, aunque el método no se ha sometido a estudio interlaboratorios.

5. Para otros fines, es necesario determinar con mayor precisión la concentración de la sustancia problema en el efluente, para lo cual hace falta un método de mayor envergadura. Por ejemplo, la proporción de lodo retirado debe regularse de forma más precisa a lo largo de cada día y de cada fase del ensayo, y las unidades deben funcionar a diversas proporciones de retirada. Para que el método sea totalmente exhaustivo, es necesario hacer ensayos a dos o tres temperaturas diferentes. Un método de este tipo es descrito por Birch (13) (14) y se resume en el apéndice 6. Sin embargo, los conocimientos actuales son insuficientes para decider cuál de los modelos cinéticos es aplicable a la biodegradación de las sustancias en la depuración de aguas residuales y en el medio acuático en general. La aplicación de una cinética de Monod, señalada en el apéndice 6 como ejemplo, se limita a las sustancias presentes a una concentración de 1 mg/l o más pero, en opinión de algunos autores, incluso este extremo está aún por confirmar. En el apéndice 7 se indican ensayos a concentraciones que reflejan con mayor fidelidad las que se encuentran en las aguas residuales, pero estos ensayos, así como los del apéndice 6, se incluyen como apéndices en lugar de publicarse como métodos de ensayo aparte.

*Filtros*

6. Se ha prestado mucha menos atención a los modelos de filtros percoladores, quizá debido a que son más engorrosos y menos compactos que los modelos de instalaciones de lodo activado. Gerike *et al.* desarrollaron unas unidades de filtros por goteo y las utilizaron con el método de unidades acopladas (15). Estos filtros son relativamente grandes (2 m de altura y 60 l de volumen) y cada uno requiere hasta 2 l/h de aguas residuales. Baumann *et al.* (16) simularon filtros de goteo insertando tiras de "lana" de poliéster en tubos de 1 m (14 mm de diámetro interior) después de haberlas sumergido en lodo activado concentrado durante 30 min. Se introdujo desde arriba en el tubo vertical la sustancia problema como única fuente de C en una solución de sales minerales, y se evaluó la biodegradación midiendo el COD en el efluente y el $CO_2$ en el gas emitido.

7. Se han simulado biofiltros de otra manera (15): se ponían en contacto las superficies internas de tubos giratorios, inclinados levemente respecto a la horizontal, con aguas residuales (con un flujo de unos 250 ml/h), tanto con la sustancia problema como sin ella, y en los efluentes recogidos se examinaba la concentración de COD o la de la sustancia problema.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. El presente método está concebido para determinar la eliminación y la biodegradación primaria o la final de sustancias orgánicas hidrosolubles por microorganismos aerobios en un sistema de ensayo de funcionamiento continuo que simula el proceso del lodo activado. Las fuentes de carbono y energía para los microorganismos son un medio orgánico fácilmente biodegradable y la sustancia problema orgánica.

9. Se disponen dos unidades de prueba en funcionamiento continuo (instalaciones de lodo activado o depósitos porosos), en paralelo y en las mismas condiciones, elegidas como idóneas para el objetivo del ensayo. Normalmente, el tiempo medio de retención hidráulica es de 6 h y la edad media del lodo (tiempo de retención del lodo) está entre 6 y 10 días. El lodo se retira por uno de los dos métodos, la sustancia problema se añade normalmente al afluente (medio orgánico) de una sola de las unidades, a una concentración de entre 10 y 20 mg/l de carbono orgánico disuelto (COD). La segunda unidad sirve de control para determinar la biodegradación del medio orgánico.

▼M4

10. Se toman muestras frecuentes de los efluentes y en ellas se determina preferentemente el COD, o bien la demanda química de oxígeno (DQO), junto con la concentración de la sustancia problema (en caso necesario) mediante análisis específico, en el efluente de la unidad a la que se añade dicha sustancia. Se acepta que la diferencia entre las concentraciones de COD o de DQO en los efluentes de las unidades de ensayo y de control se debe a la sustancia problema o a sus metabolitos orgánicos. Esta diferencia se compara con la concentración en los afluentes de COD o de DQO debida a la sustancia problema, a fin de determinar la eliminación de dicha sustancia.

11. Normalmente es posible distinguir la biodegradación de la bioadsorción mediante un examen atento de la curva de eliminación respecto al tiempo, y se puede confirmar mediante un ensayo de biodegradación fácil utilizando un inóculo aclimatado procedente de la unidad que recibe la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

12. Es necesario conocer las características de pureza, hidrosolubilidad, volatilidad y adsorción de la sustancia problema para poder interpretar correctamente los resultados. Normalmente no es posible hacer el ensayo con sustancias volátiles e insolubles, salvo que se adopten precauciones especiales (véase el apéndice 5). También debe conocerse la estructura química, o al menos la fórmula empírica, para poder calcular los valores teóricos o comprobar los valores medidos de ciertos parámetros, como la demanda teórica de oxígeno (DTO), el carbono orgánico disuelto (COD) y la demanda química de oxígeno (DQO).

13. El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para los micororganismos (véase el apéndice 4) puede ser útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de la biodegradación.

UMBRALES

14. En la aplicación original de este ensayo (confirmatorio) de simulación a la biodegradación primaria de tensioactivos, se exige una eliminación del 80 % de la sustancia específica para poder comercializar el tensioactivo. Si no se alcanza el valor del 80 %, puede aplicarse este ensayo (confirmatorio) de simulación y el tensioactivo puede comercializarse solamente si se elimina más del 90 % de la sustancia específica. Con las sustancias en general, no se trata de pasar un umbral sino de que el valor obtenido del porcentaje de la eliminación pueda utilizarse para calcular aproximadamente la concentración probable en el medio ambiente que deba utilizarse en la evaluación del peligro planteado por las sustancias. Los resultados tienden a seguir un modelo de todo o nada. En una serie de estudios de sustancias puras, se observó que el porcentaje de la eliminación de COD era > 90 % en más de tres cuartos y > 80 % en más del 90 % de las sustancias que mostraban un grado significativo de biodegradabilidad.

15. Son relativamente pocas las sustancias (por ejemplo, tensioactivos) que están presentes en las aguas residuales a las concentraciones utilizadas en el presente ensayo (alrededor de 10 mg C/l). Algunas sustancias pueden resultar inhibidoras a estas concentraciones, mientras que la cinética de eliminación de otras puede ser diferente a concentraciones bajas. Podría conseguirse una evaluación más exacta de la degradación utilizando métodos modificados, con concentraciones de la sustancia problema a un nivel más bajo próximo a las situaciones reales, y los datos recogidos podrían utilizarse para calcular las constantes cinéticas. Sin embargo, aún no se han validado las técnicas experimentales necesarias, y tampoco se han establecido los modelos cinéticos que describen las reacciones de biodegradación (véase el apéndice 7).

▼M4

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

16. Para asegurarse de la correcta ejecución del procedimiento experimental, es conveniente someter a ensayo ocasionalmente sustancias cuyo comportamiento se conozca, a la vez que se investigan sustancias problema. Entre esas sustancias se cuentan el ácido adípico, el 2-fenil-fenol, el 1-naftol, el ácido difénico, el ácido 1-naftoico, etc. (9) (10) (11).

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

17. Ha habido muchos menos informes de estudios de ensayos de simulación que de ensayos de la biodegradabilidad fácil. La reproducibilidad obtenida con muestras en paralelo es buena (dentro del 10-15 %) en el caso de las sustancias problema degradadas en un 80 % o más, pero la variabilidad es mayor cuando se trata de sustancias que se degradan menos bien. Asimismo, con algunas sustancias límite se han encontrado resultados muy dispares (por ejemplo, 10 %, 90 %) en distintas ocasiones dentro del plazo de 9 semanas permitido en el ensayo.

18. Se ha observado poca diferencia en los resultados obtenidos con los dos tipos de equipo, pero algunas sustancias se han degradado de forma más amplia y sistemática en presencia de agua residual doméstica que con el agua residual sintética de la OCDE.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

**Equipo**

*Sistema de ensayo*

19. El sistema de ensayo para una sola sustancia problema consiste en una unidad de ensayo y una unidad de control, pero cuando solo se efectúan análisis específicos (biodegradación primaria) únicamente hace falta la unidad de ensayo. Una misma unidad de control puede utilizarse con varias unidades de ensayo que reciban la misma o diferentes sustancias problema. En caso de acoplamiento (apéndice 3), cada unidad de ensayo debe disponer de su propia unidad de control. El sistema de ensayo puede ser bien un modelo de instalación de lodo activado, unidad Husmann (apéndice 1, figura 1), o bien un depósito poroso (apéndice 1, figura 2). En ambos casos es necesario disponer de recipientes de almacenamiento de tamaño suficiente para los afluentes y efluentes, así como bombas para dosificar el afluente, bien mezclado con una disolución de la sustancia problema o bien aparte.

20. Cada instalación de lodo activado consiste en un recipiente de aireación con una capacidad conocida de unos 3 litros de lodo activado y en un separador (depósito de decantación secundario) de una capacidad de unos 1,5 litros; los volúmenes pueden modificarse en cierta medida ajustando la altura del depósito de decantación. Pueden utilizarse recipientes de tamaños diferentes si funcionan con presiones hidráulicas comparables. Si no es posible mantener la temperatura de la sala de ensayo en la banda deseada, se recomienda utilizar recipientes con camisa de agua a temperatura regulada. Se utiliza una bomba de elevación por aire comprimido o una bomba dosificadora para reciclar el lodo activado, pasándolo desde el depósito de decantación al recipiente de aireación, bien de forma continua o bien de forma intermitente, a intervalos periódicos.

21. El sistema de depósito poroso consiste en un cilindro interior, poroso, de fondo cónico, incluido en un recipiente algo más grande, de la misma forma, pero hecho de material plástico impermeable. El recipiente poroso puede estar hecho, por ejemplo, de polietileno poroso con un diámetro máximo de poro de 90 μm y 2 mm de espesor. La separación del lodo respecto al medio orgánico tratado se efectúa mediante el paso diferencial a través de la pared porosa. Los efluentes se recogen en el espacio anular a partir del cual rebosan al recipiente de recogida. No se produce sedimentación y, por tanto, no hay retorno del

▼M4

lodo. El sistema en conjunto puede estar montado en un baño de agua de temperatura regulada. Los depósitos porosos se pueden bloquear y rebosar en las fases iniciales. En tal caso, se debe sustituir el forro poroso por uno limpio, pasando previamente con sifón el lodo del depósito a un cubo limpio y extrayendo el forro bloqueado. Tras limpiar el cilindro exterior impermeable, se inserta un forro limpio y se devuelve el lodo al depósito. El lodo que pueda quedar adherido a los lados del forro bloqueado se raspa cuidadosamente y se transfiere también. Los depósitos bloqueados se limpian primero con un chorro fino de agua para eliminar el lodo restante; luego se sumergen en solución diluida de hipoclorito sódico y después en agua; finalmente, se enjuagan a fondo con agua.

22. Para la aireación del lodo en los recipientes de aireación de ambos sistemas, es necesario aplicar técnicas adecuadas como, por ejemplo, cubos sinterizados (piedras difusoras) y aire comprimido. El aire se limpiará, en caso necesario, pasándolo por un filtro adecuado y lavándolo. Debe pasar suficiente aire a través del sistema para mantener las condiciones aeróbicas y mantener en suspensión los flóculos de lodo todo el tiempo que dure el ensayo.

*Equipo de filtración o centrífuga*

23. Dispositivo de filtración de muestras con filtros de membrana de porosidad adecuada (diámetro de abertura nominal de 0,45 μm) que adsorban sustancias orgánicas solubles y liberen carbono orgánico en un grado mínimo. Si se utilizan filtros que liberan carbono orgánico, lavar cuidadosamente los filtros con agua caliente para eliminar el carbono orgánico lixiviable. Otra posibilidad es utilizar una centrífuga que pueda alcanzar una aceleración de 40 000 $m/s^2$.

*Equipo analítico*

24. Equipo necesario para determinar:

— el COD (carbono orgánico disuelto) y el COT (carbono orgánico total), o la DQO (demanda química de oxígeno),

— la sustancia específica, en su caso,

— los sólidos en suspensión, el pH, la concentración de oxígeno en el agua,

— la temperatura, la acidez y la alcalinidad,

— el amonio, el nitrito y el nitrato, si el ensayo se efectúa en condiciones de nitrificación.

*Agua*

25. Agua del grifo, con menos de 3 mg/l de COD. Debe determinarse la alcalinidad, en caso de que no se conozca previamente.

26. Agua desionizada, con menos de 2 mg/l de COD.

*Medio orgánico*

27. Como medio orgánico puede aceptarse agua residual sintética, agua residual doméstica o una mezcla de ambos tipos. Se ha observado (11) (14) que el uso de agua residual doméstica sola suele llevar a un mayor porcentaje de eliminación del COD y que incluso permite la eliminación y la biodegradación de algunas sustancias no biodegradadas cuando se utiliza el agua residual sintética de la OCDE. Asimismo, la adición constante o intermitente de agua residual doméstica suele estabilizar el lodo activado, incluida la capacidad crucial de sedimentar bien. Así pues, se recomienda el uso de agua residual doméstica. Debe medirse la concentración de COD o de DQO en cada nuevo lote de medio orgánico. Es necesario conocer la acidez o la alcalinidad del medio orgánico. Es posible que el medio orgánico requiera la adición de un amortiguador adecuado (carbonato de hidrógeno y sodio, o fosfato de dihidrógeno y potasio) si es baja su acidez o su alcalinidad, para mantener durante el ensayo un pH de alrededor de 7,5 ± 0,5 en el recipiente de aireación. Debe decidirse en cada caso la cantidad de amortiguador que ha de añadirse, y en qué momento hacerlo. Cuando se hagan mezclas tanto de forma continua como de forma intermitente, es necesario mantener aproximadamente constante el valor del COD (o de la DQO) de la mezcla, por ejemplo mediante dilución con agua.

▼M4

*Agua residual sintética*

28. Disuélvase en cada litro de agua del grifo: peptona, 160 mg; extracto de carne, 110 mg; urea, 30 mg; fosfato de hidrógeno y dipotasio anhidro ($K_2HPO_4$), 28 mg; cloruro de sodio (NaCl), 7 mg; cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; sulfato de magnesio heptahidratado ($Mg_2SO_4.7H_2O$), 2 mg. El agua residual sintética de la OCDE es un ejemplo y da una concentración media de COD en el afluente de unos 100 mg/l. También es posible utilizar otras composiciones, con la misma concentración aproximada de COD, que se acerquen más al agua residual real. Si hace falta un afluente menos concentrado, puede diluirse el agua residual sintética, por ejemplo en la proporción 1:1, con agua del grifo para obtener una concentración de unos 50 mg/l. Este afluente más débil permitirá un mejor crecimiento de los organismos nitrificantes, y esta modificación debe utilizarse si se tiene que investigar la simulación de las instalaciones de aguas residuales nitrificantes. El agua residual sintética puede elaborarse con agua destilada en forma concentrada y conservarse a alrededor de 1 °C durante una semana como máximo. En el momento en que se necesite, se diluye con agua del grifo. (Este medio no es satisfactorio ya que, por ejemplo, la concentración de nitrógeno es muy elevada y el contenido de carbono es relativamente bajo, pero no se ha sugerido nada mejor, salvo añadir más fosfato como amortiguador y peptona adicional.)

*Agua residual doméstica*

29. Debe utilizarse agua residual recién decantada, recogida cada día en una depuradora que reciba predominantemente agua residual doméstica. Debe recogerse, antes de la sedimentación primaria, del canal del rebosadero del tanque de sedimentación primaria o de la alimentación a la instalación de lodo activado y encontrarse exenta en gran medida de partículas gruesas. El agua residual puede seguir utilizándose tras guardarse varios días (pero en general no más de siete días) a una temperatura de unos 4 °C, si se demuestra que el COD (o la DQO) no ha descendido de forma significativa (es decir, en menos del 20 %) durante el almacenamiento. A fin de limitar las perturbaciones del sistema, el COD (o la DQO) de cada lote nuevo debe ajustarse a un nivel constante adecuado, antes de utilizarlo, por ejemplo, mediante dilución con agua del grifo.

*Lodo activado*

30. Debe recogerse lodo activado para la inoculación, a partir del tanque de aireación de una depuradora de aguas residuales que funcione bien o de una unidad de lodo activado de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas.

*Soluciones madre de sustancia problema*

31. Con sustancias de solubilidad adecuada, deben prepararse soluciones madre a concentraciones apropiadas (por ejemplo, de 1 a 5 g/l) en agua desionizada, o en la porción mineral del agua residual sintética (respecto a las sustancias insolubles y volátiles, véase el apéndice 5). Hay que determinar el COD y el carbono orgánico total (COT) de la solución madre y repetir las mediciones con cada lote nuevo. Si la diferencia entre el COD y el COT es superior al 20 %, ha de comprobarse la hidrosolubilidad de la sustancia problema. Hay que comparar los valores nominales con los valores de COD o la concentración de la sustancia problema medidos por análisis específico de la solución madre, para considerar si la recuperación es suficientemente buena (normalmente puede esperarse > 90 %). Ha de comprobarse, especialmente en el caso de dispersiones, si el COD puede utilizarse como parámetro analítico o si solo es posible utilizar una técnica analítica específica para la sustancia problema. En el caso de dispersiones es necesario centrifugar las muestras. Con cada lote nuevo hay que medir el COD, la DQO o la sustancia mediante análisis específico.

▼M4

32. Determínese el pH de la solución madre. La presencia de valores extremos indica que la adición de la sustancia puede influir en el pH de lodo activado en el sistema de ensayo. En este caso, haya que neutralizar la solución madre para obtener un pH de 7 ± 0,5, utilizando pequeñas cantidades de ácidos o bases inorgánicos, pero evitando la precipitación de la sustancia problema.

PROCEDIMIENTO

33. Se describe el procedimiento para las unidades de instalaciones de lodo activado; para el sistema de depósito poroso ha de adaptarse ligeramente.

*Preparación del inóculo*

34. Inocúlese el sistema de ensayo al inicio del ensayo con lodo activado o bien con un inóculo que contenga una pequeña concentración de microorganismos. Manténgase el inóculo aireado a temperatura ambiente hasta que se vaya a utilizar, en el plazo máximo de 24 h. En el primer caso, tómese una muestra de lodo activado del tanque de aireación de una depuradora biológica de aguas residuales que funcione con eficiencia o bien de una depuradora de laboratorio, que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Si se van a simular condiciones de nitrificación, tómese lodo de una depuradora de aguas residuales de nitrificación. Determínese la concentración de sólidos en suspensión y, en caso necesario, concéntrese el lodo por sedimentación, de forma que el volumen añadido al sistema de ensayo sea mínimo. Ha de asegurarse que la concentración inicial de materia seca es de alrededor de 2,5 g/l.

35. En el segundo caso, utilícense como inóculo entre 2 ml/l y 10 ml/l de un efluente procedente de una depuradora biológica de aguas residuales domésticas. Para conseguir tantas especies diferentes de bacterias como sea posible, puede ser conveniente añadir inóculos procedentes de otras fuentes diversas como, por ejemplo, aguas superficiales. En este caso, el lodo activado se va a desarrollar y crecer en el sistema de ensayo.

*Dosificación del medio orgánico*

36. Hay que asegurarse de que los recipientes del afluente y del efluente, así como los tubos que los unen, se limpian a fondo para eliminar la eventual proliferación microbiana, tanto al principio como durante todo el ensayo. Móntense los sistemas de ensayo en salas donde la temperatura esté regulada (normalmente en la banda de 20-25 °C) o utilícense unidades de ensayo provistas de camisas de agua. Prepárese un volumen suficiente del medio orgánico requerido (puntos 27-29). Llénese inicialmente el recipiente de aireación y el depósito de decantación con el medio orgánico y añádase el inóculo (puntos 34 y 35). Iníciese la aireación de forma que el lodo se mantenga en suspensión y en condiciones aeróbicas, y empiécese a introducir el afluente y a reciclar el lodo sedimentado. Pásese medio orgánico de los recipientes de almacenamiento a los de aireación (puntos 20 y 21) de las unidades de ensayo y de control, y recójanse los efluentes respectivos en recipientes de almacenamiento similares. Para conseguir el tiempo normal de retención hidráulica de 6 h, el medio orgánico se bombea con un caudal de 0,5 l/h. A fin de confirmar este extremo, mídase la cantidad diaria de medio orgánico introducido anotando la reducción de volumen del medio presente en los recipientes de almacenamiento. Serían necesarios otros modos de dosificación para determinar los efectos de una liberación intermitente y de una aportación de sustancias de "choque".

37. Si el medio orgánico se prepara para utilizarlo durante un plazo superior a 1 día, es necesario enfriarlo a unos 4 °C o aplicar otros métodos adecuados de conservación para impedir el crecimiento microbiano y la biodegradación fuera de las unidades de ensayo (punto 29). Si se utiliza agua residual sintética, es posible preparar y conservar a unos 4 °C una solución madre concentrada (por ejemplo, a una concentración 10 veces superior a la normal, punto 28) Esta solución madre puede mezclarse bien con el volumen adecuado de agua del grifo antes de utilizarla; otra posibilidad consiste en bombearla directamente a la vez que se bombea aparte la cantidad adecuada de agua del grifo.

▼M4

*Dosificación de la sustancia problema*

38. Añádase un volumen adecuado de la solución madre de sustancia problema (punto 31) al recipiente de almacenamiento del afluente o introdúzcase directamente con una bomba aparte en el recipiente de aireación. La concentración de ensayo media normal en el afluente debe situarse entre 10 y 20 mg/l de COD, con una concentración máxima no superior a 50 mg/l. Si la hidrosolubilidad de la sustancia problema es baja o resulta probable que aparezcan efectos tóxicos, puede reducirse la concentración a 5 mg/l de COD, o incluso menos, pero solo si existe y se utiliza un método analítico específico adecuado (las sustancias problema dispersadas que son poco hidrosolubles pueden añadirse mediante técnicas de dosificación especiales, véase el apéndice 5).

39. Se empieza a añadir la sustancia problema cuando el sistema se haya estabilizado y ya esté reduciendo eficientemente el COD del medio orgánico (alrededor del 80 %). Es importante comprobar que todas las unidades funcionan con la misma eficiencia antes de la adición de la sustancia problema; en caso contrario, suele ser útil mezclar los distintos lodos y volver a repartirlos en cantidades iguales a cada unidad. Cuando se utilice un inóculo de unos 2,5 g/l (en peso seco), es posible añadir la sustancia problema desde el inicio del ensayo ya que la adición directa de cantidades crecientes desde el principio ofrece la ventaja de que el lodo activado puede adaptarse mejor a la sustancia problema. Independientemente de la manera de añadir la sustancia problema, se recomienda que se midan a intervalos regulares el caudal pertinente y/o los volúmenes de los recipientes de almacenamiento.

*Manipulación del lodo activado*

40. La concentración de sólidos del lodo activado suele estabilizarse entre unos límites durante el ensayo, independientemente del inóculo utilizado, en la banda de 1 a 3 g/l (en peso seco), en función de la calidad y de la concentración del medio orgánico, las condiciones de funcionamiento, la naturaleza de los microorganismos presentes y la influencia de la sustancia problema.

41. Procédase bien a determinar los sólidos en suspensión de los recipientes de aireación al menos una vez por semana y desechar el exceso de lodo para mantener la concentración entre 1 y 3 g/l (en peso seco), o bien a controlar la edad media del lodo para conseguir un valor constante, normalmente en la banda de 6 a 10 días. Si, por ejemplo, se elige un tiempo de retención del lodo de 8 días, hay que eliminar cada día 1/8 del volumen del lodo activado presente en el recipiente de aireación y desecharlo. Esta operación debe realizarse cada día o, preferentemente, mediante una bomba que funcione de forma automática e intermitente. El mantener constante (o dentro de unos límites estrechos) la concentración de sólidos en suspensión no mantiene constante el tiempo de retención del lodo (TRL), que es la variable operativa que determina el valor de la concentración de la sustancia problema en el efluente.

42. A lo largo de todo el ensayo debe retirarse, con una fecuencia al menos diaria, todo el lodo que se adhiera a las paredes del recipiente de aireación y del depósito de decantación, de forma que se vuelva a suspender. Obsérvense y límpiense periódicamente todos los tubos para evitar el crecimiento de biopelículas. El lodo sedimentado del depósito de decantación se recicla introduciéndolo de nuevo en el recipiente de aireación, de preferencia mediante bombeo intermitente. En el sistema de depósito poroso no se efectúa ningún reciclado, pero ha de asegurarse la introducción de cilindros internos limpios antes de que el volumen del recipiente aumente significativamente (punto 21).

43. En las unidades Husmann puede darse escasa sedimentación y pérdida de lodo. Estas unidades pueden rectificarse aplicando una o varias de las medidas que figuran a continuación, en paralelo en las unidades de ensayo y de control:

— puede añadirse a intervalos periódicos (por ejemplo, cada semana) lodo nuevo o floculante (por ejemplo, 2 ml/recipiente de solución de $FeCl_3$ de 50 g/l), pero asegurándose de que no se produce ninguna precipitación ni reacción de la sustancia problema con el $FeCl_3$,

▼M4

— puede sustituirse la bomba de elevación por aire comprimido mediante una bomba peristáltica, permitiendo así un flujo de recirculación de lodo que compensa aproximadamente el flujo de afluente que debe utilizarse y permitiendo el desarrollo de una zona anaerobia en el lodo sedimentado (la geometría de la bomba de aire comprimido limita el caudal mínimo del lodo retornado a unas 12 veces el del afluente),

— puede bombearse intermitentemente lodo desde el depósito de decantación al recipiente de aireación (por ejemplo, 5 min. cada 2,5 h para reciclar entre 1 l/h y 1,5 l/h),

— puede utilizarse un agente antiespumante no tóxico a una concentración mínima, para evitar pérdidas por formación de espuma (por ejemplo, aceite de silicona),

— puede pasarse aire a través del lodo en el depósito de decantación en forma de fuertes impulsos breves (por ejemplo, de 10 sec cada hora),

— es posible añadir el medio orgánico al recipiente de aireación a intervalos (por ejemplo, de 3 a 10 min cada hora).

*Muestreo y análisis*

44. A intervalos periódicos debe medirse la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura y el valor del pH del lodo activado presente en los recipientes de aireación. Hay que velar por que siempre se disponga de oxígeno suficiente (> 2 mg/l) y que la temperatura se mantenga en la banda necesaria (normalmente, de 20 a 25 °C). Manténgase el pH a 7,5 ± 0,5 añadiendo al recipiente de aireación o al afluente pequeñas cantidades de base o ácido inorgánico, o aumentando la capacidad de amortiguación del medio orgánico (véase el punto 27). Cuando se efectúa la nitrificación se produce ácido: la oxidación de 1 mg de N produce el equivalente de unos 7 mg de $CO_3^-$. La frecuencia de las mediciones depende del parámetro que se mida y de la estabilidad del sistema, y puede variar entre diaria y semanal.

45. Mídanse el COD o la DQO en los afluentes que entran en los recipientes de control y de ensayo. Mídase la concentración de la sustancia problema en el afluente de la unidad de ensayo mediante análisis específico o estímese a partir de la concentración en la solución madre (punto 31), el volumen utilizado y la cantidad de agua residual introducida en la unidad de ensayo. Se recomienda calcular la concentración de la sustancia problema para reducir la variabilidad de los datos de concentración.

46. Tómense muestras adecuadas del afluente recogido (por ejemplo, muestras compuestas de 24 h) y filtrense por una membrana de 0,45 μm de diámetro de poro, o centrifúguense a unos 40 000 $m/s^2$ durante 15 min aproximadamente. La centrifugación debe utilizarse si resulta difícil realizar la filtración. Determínese el COD o la DQO al menos por duplicado para medir la biodegradación final y, en caso necesario, la biodegradación primaria mediante un análisis específico de la sustancia problema.

47. El uso del COD puede ocasionar problemas analíticos a concentraciones bajas, por lo que se recomienda solo si se utiliza una concentración suficientemente alta de la sustancia problema (unos 30 mg/l). Asimismo, en caso de sustancias muy adsorbentes, se recomienda medir la cantidad de sustancia adsorbida en el lodo mediante una técnica analítica específica de la sustancia problema.

48. La frecuencia del muestreo depende de la duración prevista del ensayo. Es recomendable una frecuencia de tres veces por semana. Una vez que las unidades estén funcionando con eficiencia, debe dejarse pasar entre 1 semana y un máximo de 6 semanas después de la introducción de la sustancia problema, para permitir que se alcance el estado de equilibrio. Es preferible obtener al menos 15 valores válidos en la fase de meseta (punto 59), que dura normalmente 3 semanas, para la evaluación del resultado del ensayo. El ensayo puede completarse si se alcanza un grado suficiente de eliminación (por ejemplo, > 90 %) y se dispone de estos 15 valores, que representan análisis efectuados cada día laborable durante 3 semanas. Normalmente, no debe llegarse a una duración del ensayo superior a 12 semanas tras la adición de la sustancia problema.

▼M4

49. Si se produce nitrificación en el lodo, y si se quiere estudiar los efectos de la sustancia problema sobre la nitrificación, debe analizarse el contenido de amonio y/o de nitrito más nitrato en muestras tomadas del afluente de las unidades de ensayo y de control, al menos una vez por semana.

50. Todos los análisis deben llevarse a cabo lo antes posible, especialmente las determinaciones de nitrógeno. Si resulta necesario retrasar un análisis, las muestras deben conservarse a unos 4 °C a oscuras, en frascos llenos y bien cerrados. Si resulta necesario almacenar las muestras durante más de 48 h, hay que conservarlas por ultracongelación, por acidificación (por ejemplo, 10 ml/l de una solución de ácido sulfúrico de 400 g/l) o por adición de una sustancia tóxica adecuada [por ejemplo, 20 ml/l de una solución de cloruro de mercurio (II) de 10 g/l]. Hay que verificar que la técnica de conservación no altera los resultados de los análisis.

*Acoplamiento de unidades de ensayo*

51. Si se utiliza el acoplamiento (apéndice 3), hay que intercambiar cada día la misma cantidad de lodo activado (entre 150 y 1 500 ml en el caso de recipientes de aireación que contienen 3 litros de líquido) entre los recipientes de aireación de la unidad de ensayo y de su unidad de control. Si la sustancia problema se adsorbe fuertemente al lodo, debe cambiarse solo el sobrenadante de los depósitos de decantación. En ambos casos hay que aplicar un factor de corrección para calcular los resultados del ensayo (punto 55).

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

52. Calcúlese el porcentaje de eliminación de la sustancia problema en términos de COD o de DQO respecto a cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

donde:

$D_t$ = % de eliminación del COD o de la DQO al tiempo t

$C_s$ = valores de COD o DQO en el afluente debidos a la sustancia problema, de preferencia estimados a partir de la solución madre (mg/l)

E = valores de COD o DQO medidos en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l)

$E_o$ = valores de COD o DQO medidos en el afluente de control al tiempo t (mg/l)

53. El grado de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico en la unidad de control es un dato útil para evaluar la actividad de biodegradación del lodo activado durante el ensayo. Calcúlese el porcentaje de eliminación con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

donde:

$D_B$ = % de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico de la unidad de control al tiempo t

$C_M$ = valores de COD o de DQO del medio orgánico en el afluente de control (mg/l)

▼M4

También es posible calcular el porcentaje de eliminación del COD o de la DQO debidos al medio orgánico más la sustancia problema en la unidad de ensayo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

donde:

$D_T$ = % de eliminación del COD o de la DQO en la totalidad del afluente de ensayo

$C_T$ = valores de COD o de DQO de la totalidad del afluente de ensayo o calculados a partir de las soluciones madre (mg/l)

54. Calcúlese la eliminación de la sustancia problema si se mide con un método analítico específico en cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

donde:

$D_{ST}$ = % de eliminación primaria de la sustancia problema al tiempo t

$S_i$ = concentración medida o estimada de la sustancia problema en el afluente de ensayo (mg/l)

$S_e$ = concentración medida de la sustancia problema en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l)

55. Si se ha utilizado el modo de acoplamiento, compénsese la dilución de la sustancia problema en el recipiente de aireación debida al intercambio de lodo utilizando un factor de corrección (véase el apéndice 3). Si se ha aplicado un tiempo medio de retención hidráulica de 6 h y el intercambio de la mitad del volumen del lodo activado en el recipiente de aireación, es necesario corregir los valores de eliminación determinados diariamente ($D_t$, punto 52) para obtener el grado real de eliminación, $D_{tc}$, de la sustancia problema con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

**Expresión de los resultados del ensayo**

56. Represéntese el porcentaje de eliminación $D_t$ (o $D_{tc}$) y $D_{st}$, si está disponible, frente al tiempo (véase el apéndice 2). Es posible extraer conclusiones sobre el proceso de eliminación a partir de la forma de la curva de eliminación de la sustancia problema (en sí misma o como COD).

*Adsorción*

57. Si desde el inicio del ensayo se observa una elevada eliminación del COD de la sustancia problema, es probable que esta se elimine por adsorción a los sólidos del lodo activado. Es posible comprobar este extremo determinando la sustancia problema adsorbida mediante análisis específico. No es normal que la eliminación del COD de sustancias adsorbidas se mantenga elevada durante todo el ensayo; normalmente la eliminación es intensa al principio y después va cayendo gradualmente hasta alcanzar un valor de equilibrio. Si, no obstante, la sustancia problema adsorbida pudiera causar de alguna forma la aclimatación de la población microbiana, la eliminación del COD de la sustancia problema aumentaría posteriormente y alcanzaría un elevado nivel de meseta.

▼M4

*Tiempo de latencia*

58. Como en los ensayos estáticos exploratorios, muchas sustancias problema requieren una fase de latencia antes de que se produzca la biodegradación plena. En esta fase de latencia tiene lugar la aclimatación o adaptación de las bacterias de degradación, sin que haya apenas eliminación de la sustancia problema; después empieza el crecimiento de estas bacterias. Esta fase termina y se supone que comienza la fase de degradación cuando se ha eliminado alrededor del 10 % de la cantidad inicial de sustancia problema (después de tener en cuenta la adsorción, en su caso). La fase de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

*Fase de meseta*

59. La fase de meseta de una curva de eliminación en un ensayo continuo se define como la fase en que se produce el máximo de degradación. La fase de meseta debe durar al menos 3 semanas y permitir la medición de unos 15 valores válidos.

*Grado medio de eliminación de la sustancia problema*

60. Calcular la media de los valores de eliminación ($D_t$) de la sustancia problema en la fase de meseta. Redondeado al entero más próximo (1 %), es el grado de eliminación de la sustancia problema. Se recomienda calcular asimismo el intervalo de confianza del 95 % para la media.

*Eliminación del medio orgánico*

61. Represéntese frente al tiempo el porcentaje de eliminación del COD o de la DQO del medio orgánico en la unidad de control ($D_B$). Indíquese el grado medio de eliminación de la misma forma que con la sustancia problema (punto 60).

*Indicación de la biodegradación*

62. Si la sustancia problema no se adsorbe significativamente al lodo activado y la curva de eliminación tiene la forma típica de una curva de biodegradación con fases de latencia, de degradación y de meseta (puntos 58 y 59), la eliminación medida puede atribuirse con seguridad a la biodegradación. Si ha tenido lugar una eliminación inicial importante, el ensayo de simulación no puede diferenciar entre el proceso de eliminación biológico y el abiótico. En tales casos, y en otros en que haya alguna duda sobre la biodegradación (por ejemplo, si se produce eliminación), se deben analizar las sustancias problema adsorbidas o efectuar ensayos adicionales de biodegradación estática, con parámetros que indiquen claramente si se trata de procesos biológicos. Tales ensayos son los métodos de consumo de oxígeno [capítulo C.4-D, E y F del presente anexo (6)] o un ensayo con medición de la producción de dióxido de carbono [capítulo C.4-C del presente anexo (6)], o el método del espacio de cabeza de la ISO (18), utilizando un inóculo preexpuesto del ensayo de simulación. Si se han medido tanto la eliminación del COD como la eliminación específica de la sustancia, una diferencia significativa (siendo la primera más baja que la segunda) entre los porcentajes de eliminación indica la presencia en los efluentes de productos orgánicos intermedios que pueden ser más difíciles de degradar que la sustancia original.

*Validez de los resultados del ensayo*

63. Mediante la determinación del grado de eliminación del medio orgánico (punto 53) en la unidad de control se consigue información sobre el comportamiento normal de biodegradación del inóculo. Se considera que el ensayo es válido si el grado de eliminación del COD o de la DQO en la unidad o unidades de control es > 80 % tras dos semanas y no se han observado fenómenos inusuales.

▼M4

64. Si se ha utilizado una sustancia (de referencia) fácilmente biodegradable, el grado de biodegradación ($D_t$, punto 52) debe ser > 90 %.

65. Si el ensayo se realiza en condiciones de nitrificación, la concentración media en los efluentes debe ser < 1 mg/l de N amoniacal y < 2 mg/l de N nitroso.

66. Si no se cumplen estos criterios (puntos 63-65), repítase el ensayo utilizando un inóculo de una fuente diferente, sométase a ensayo una sustancia de referencia y revísense todos los procedimientos experimentales.

**Informe del ensayo**

67. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Datos de identificación.

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas.

*Condiciones de ensayo:*

— Tipo de sistema de ensayo, eventuales modificaciones para el ensayo de sustancias insolubles y volátiles.

— Tipo de medio orgánico.

— Proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se conocen.

— Inóculo, naturaleza y lugar o lugares de recogida, concentración y posible tratamiento previo.

— Solución madre de sustancia problema: contenido de COD y COT, forma de preparación si se trata de una suspensión, concentración utilizada en el ensayo, justificación del eventual recurso a concentraciones fuera de la banda de 10 a 20 mg/l de COD, método de adición, fecha de la primera adición, cambios eventuales.

— Edad media del lodo y tiempo medio de retención hidráulica, método de retirada del lodo, métodos para solucionar la aglomeración, la pérdida de lodo, etc.

— Técnicas analíticas empleadas.

— Temperatura del ensayo.

— Cualidades de la aglomeración del lodo, índice volumétrico de lodo (IVL), sólidos en suspensión en el licor mixto (SSLM).

— Eventuales desviaciones respecto a los procedimientos normalizados y circunstancias que puedan afectar a los resultados.

*Resultados del ensayo:*

— Todos los datos medidos (COD, DQO, análisis específicos, pH, temperatura, concentración de oxígeno, sólidos en suspensión, sustancias nitrogenadas (cuando sea pertinente).

— Todos los valores calculados de $D_t$ (o $D_{tc}$), $D_B$, $D_{St}$ obtenidos en formato tabular y las curvas de eliminación.

— Información de las fases de latencia y de meseta, duración del ensayo, grado de eliminación de la sustancia problema y del medio orgánico en la unidad de control, junto con información estadística y declaraciones sobre la biodegradabilidad y la validez del ensayo.

— Discusión de los resultados.

▼**M4**

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.

(2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.

(3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.

(4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909-915.

(5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.

(6) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

(7) Capítulo C.12 del presente anexo. Biodegradación — Prueba LASC modificada.

(8) Capítulo C.19 del presente anexo. Cálculo del coeficiente de adsorción (KOC) en suelos y en lodos de aguas residuales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

(9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157-173.

(10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45-55.

(11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp. 113-138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(12) ISO 11733 (1995; revisada de 2004). Evaluación de la eliminación y de la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos en medio acuoso-ensayo de simulación de lodos activados.

(13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornadas Com. Español. Deterg.: 33-48.

(14) Birch RR (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340-343.

(15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat. Res. 14: 753-758.

(16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(17) Her Majesty's Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91-98 ISBN 011 751661 9.

(18) ISO 14593 (1998). Calidad del agua-Evaluación de la biodegradabilidad final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico en recipientes cerrados.

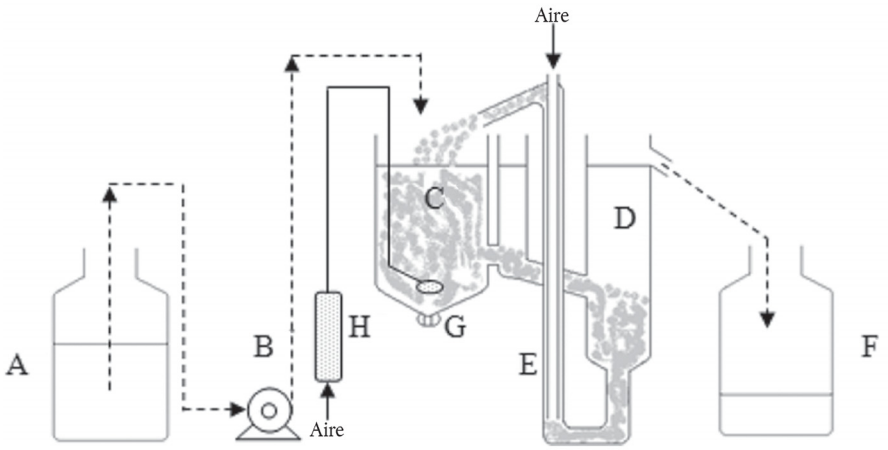
▼**M4**

*Apéndice 1*

*Figura 1*

**Equipo utilizado para evaluar la biodegradabilidad**

Unidad de Husmann




A. Recipiente de almacenamiento

B. Bomba dosificadora

C. Cámara de aireación (3 l de capacidad)

D. Recipiente de sedimentación

E. Bomba de elevación por aire comprimido

F. Recipiente de recogida

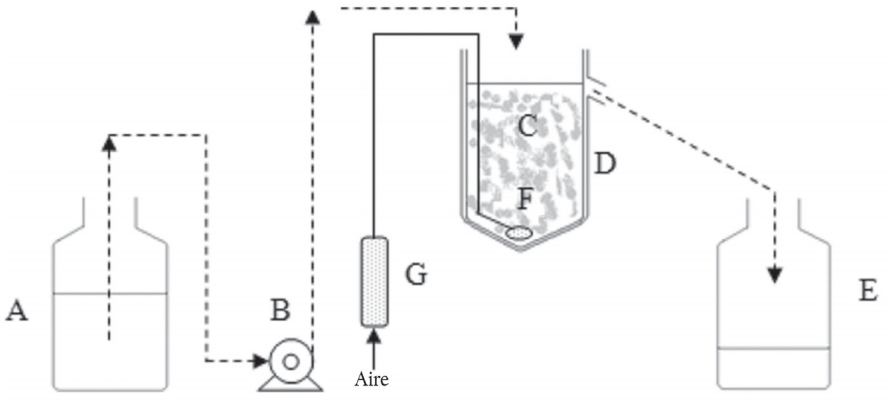
G. Aireador

H. Caudalímetro de aire

*Figura 2*

**Equipo utilizado para evaluar la biodegradabilidad**

Depósito poroso




A. Recipiente de almacenamiento

B. Bomba dosificadora

C. Recipiente de aireación poroso

D. Recipiente impermeable exterior

E. Recipiente de recogida

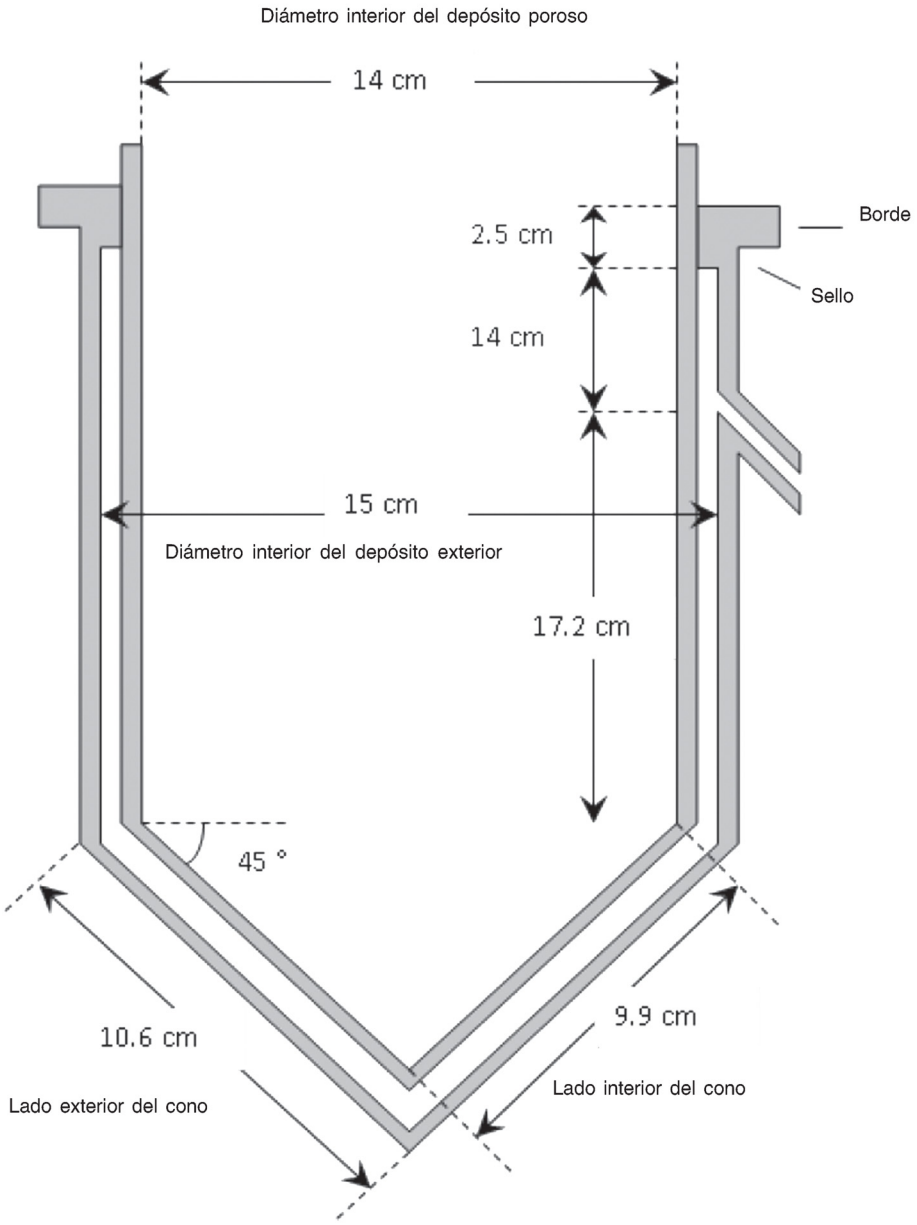
F. Difusor

G. Caudalímetro de aire

▼**M4**

*Figura 3*

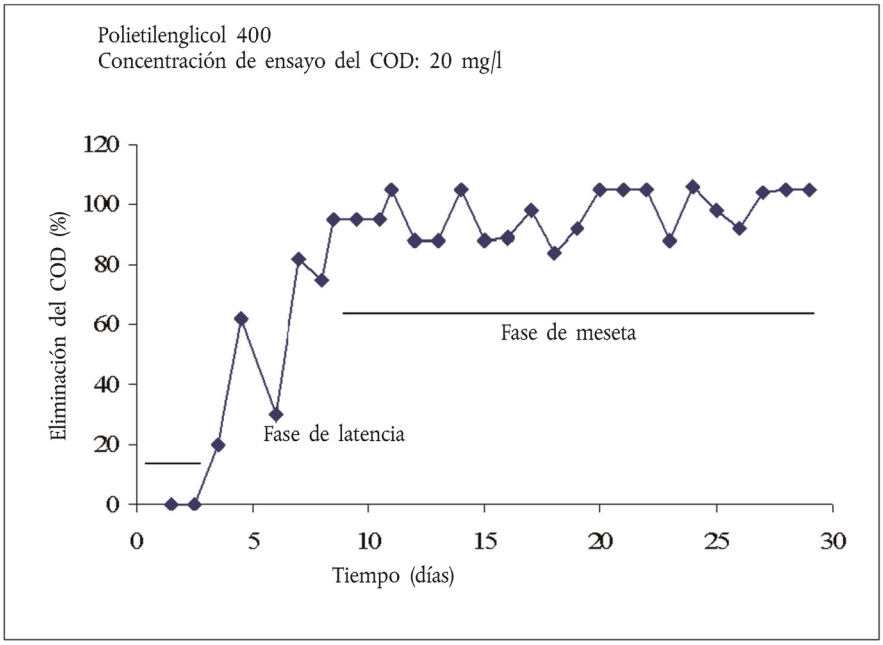
**Detalles del recipiente de aireación con depósito poroso de tres litros**



▼**M4**

*Apéndice 2*

***Ejemplo de curva de eliminación***



▼M4

*Apéndice 3*

[CON CARÁCTER INFORMATIVO]

ACOPLAMIENTO DE LAS UNIDADES DE ENSAYO

A fin de equilibrar las poblaciones microbianas de los lodos presentes en la unidad de ensayo, que recibe el agua residual más la sustancia problema, y en la unidad de control, que solo recibe el agua residual, se introdujo el intercambio diario de lodos (1). El procedimiento se denominó acoplamiento y el método se conoce como el de unidades acopladas. El acoplamiento se llevó a cabo inicialmente utilizando las unidades de lodo activado de Husmann, pero también se ha aplicado a unidades de depósito poroso (2) (3). No se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos utilizando unidades acopladas y los obtenidos utilizando unidades no aclopadas, ni con unidades Husmann ni con depósitos porosos, por lo que no ofrece ninguna ventaja dedicar tiempo y energía a acoplar las unidades.

Los intercambios de lodos pueden dar la apariencia de una eliminación considerable, ya que parte de la sustancia problema se transfiere y las concentraciones de esta sustancia problema en los efluentes de ensayo y de control llegan a equilibrarse más. Así pues, es necesario utilizar factores de corrección, que dependen de la fracción intercambiada y del tiempo medio de retención hidráulica. Se han publicado más detalles del cálculo (1).

Calcúlese el grado corregido de eliminación de COD o de DQO utilizando la fórmula general siguiente:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

donde:

$D_{tc}$ = porcentaje corregido de eliminación de COD o de DQO

$D_t$ = porcentaje determinado de eliminación de COD o de DQO

a = fracción intercambiada del volumen de las unidades de lodo activado

r = tiempo medio de retención hidráulica (h)

Si, por ejemplo, se intercambia la mitad del volumen del tanque de aireación (a = 0,5) y el tiempo medio de retención hidráulica es de 6 h, la fórmula de corrección es la siguiente:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Fischer W, Gerike P, Holtmann W (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131-1135.

(2) Painter HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113-138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.

(3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

*Apéndice 4*

EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DEL LODO ACTIVADO

**Procedimiento con sustancias problema**

1. Es posible que una sustancia (o un agua residual) no se degrade ni se elimine en el ensayo de simulación, e incluso que tenga un efecto inhibidor sobre los microorganismos del lodo. Otras sustancias se biodegradan a pequeñas concentraciones pero son inhibidoras a concentraciones más elevadas (hormesis). Los efectos inhibidores pueden haberse puesto de manifiesto en una fase anterior o haberse determinado en un ensayo de toxicidad, utilizando un inóculo similar o idéntico al utilizado en el ensayo de simulación (1). Tales métodos son la inhibición del consumo de oxígeno [capítulo C.11 del presente anexo (2) y norma ISO 8192(3)] o la inhibición del crecimiento de los organismos del lodo [ISO 15522 (4)].

2. En el ensayo de simulación, la eventual inhibición se manifiesta en que la diferencia en carbono orgánico disuelto (COD) o en demanda química de oxígeno (DQO) entre el efluente del recipiente de ensayo y el del recipiente de control es mayor que el COD añadido como sustancia problema. Dicho de otra manera, el porcentaje de eliminación de COD [(y de demanda bioquímica de oxígeno (DBO), de demanda química de oxígeno (DQO) y/o de $NH^{+}_{4}$)] del medio orgánico en tratamiento se ve reducido por la presencia de la sustancia problema. Si ocurre esto, es necesario repetir el ensayo reduciendo la concentración de la sustancia problema hasta que se alcance un nivel al que no se produzca inhibición, y quizás reduciendo aún más la concentración hasta que la sustancia problema sea biodegradada. Sin embargo, si la sustancia problema (o el agua residual) tiene efectos negativos sobre el proceso a todas las concentraciones ensayadas, se puede deducir que la sustancia es difícil, o incluso imposible, de tratar biológicamente, pero puede merecer la pena repetir el ensayo con lodo activado procedente de otra fuente o someter el lodo a una aclimatación más gradual.

3. Inversamente, si la sustancia problema se bioelimina al primer intento en el ensayo de simulación, debe aumentarse su concentración cuando se necesite saber si esta sustancia puede ser inhibidora.

4. Al tratar de determinar el grado de inhibición, ha de tenerse presente que puede cambiar la población del lodo activado, de forma que con el tiempo los microorganismos pueden desarrollar tolerancia frente a una sustancia inhibidora.

5. Cálculo del grado de inhibición:

   Los porcentajes generales de eliminación $R_o$, de DBO, COD, DQO, etc., de las unidades de ensayo y de control pueden calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\%$$

   donde:

   I = concentración de DBO, COD, DQO, etc., en los afluentes de los recipientes de ensayo o de control (mg/l)

   E = concentraciones en los efluentes respectivos (mg/l)

   Es necesario corregir I y E para tener en cuenta el COD debido a la sustancia problema en las unidades de ensayo; en caso contario, serán incorrectos los cálculos del porcentaje de inhibición.

▼**M4**

El grado de inhibición debido a la presencia de la sustancia problema puede calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibicion} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

donde:

$R_c$ = porcentaje de eliminación en los recipientes de control

$R_t$ = porcentaje de eliminación en los recipientes de ensayo

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Reynolds L *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.

(2) Capítulo C.11 del presente anexo. Biodegradación — Lodo activado: Prueba de inhibición de la respiración.

(3) ISO 8192 (2007): Calidad del agua — Ensayo de inhibición del consumo de oxígeno por lodos activados por oxidación del carbono y del amonio.

(4) ISO 15522 (1999) Calidad del agua — Determinación del efecto inhibidor de los componentes del agua sobre los microorganismos de los lodos activados.

▼M4

*Apéndice 5*

**Sustancias problema poco hidrosolubles — sustancias volátiles**

**Sustancias poco hidrosolubles**

Parece que se han publicado pocos informes sobre la posibilidad de someter las sustancias poco hidrosolubles e insolubles a ensayos de simulación del tratamiento de las aguas residuales (1) (2) (3).

No hay un solo método de dispersión de la sustancia problema que pueda aplicarse a todas las sustancias insolubles. Parece que dos de los cuatros tipos de métodos descritos en la norma ISO 10634 (4) pueden ser adecuados para intentar dispersar las sustancias problema para el ensayo de simulación; consisten en el uso de emulgentes y de energía de ultrasonidos. Hay que determinar la estabilidad de la dispersión resultante a lo largo de períodos de al menos 24 h. La dispersión estabilizada de forma adecuada en un depósito con agitación constante (punto 38) se pasa al tanque de aireación aparte del agua residual doméstica (o sintética).

Si las dispersiones son estables, investíguese cómo puede determinarse la sustancia problema en la forma dispersa. Resulta poco probable que el COD sea adecuado, por lo que debería establecerse un método analítico específico para la sustancia problema que pueda aplicarse a los efluentes, a los sólidos del efluente y al lodo activado. Entonces se determinaría el destino de la sustancia problema en la simulación del proceso del lodo activado, tanto en la fase líquida como en la sólida. Por tanto, se establecería un "balance de masas" para decidir si la sustancia problema se ha degradado. Sin embargo, de esta forma se indicaría solo la biodegradación primaria. Debe intentarse demostrar la biodegradación final mediante un ensayo de respirometría (capítulo C.4-C, F o D del presente anexo) (5) utilizando como inóculo lodo expuesto a la sustancia problema en el ensayo de simulación.

**Sustancias volátiles**

La aplicación de simulaciones de la depuración de agua residual a las sustancias volátiles es controvertida y problemática. Igual que en el caso de las sustancias poco hidrosolubles, se encuentran muy pocos informes publicados sobre ensayos de simulación de sustancias volátiles. Se adapta un tipo convencional de aparato de mezcla completa sellando los tanques de aireación y de sedimentación, midiendo y controlando el flujo de aire con caudalímetros y pasando el gas de salida por trampas para recoger la materia orgánica volátil. En ciertos casos se utiliza una bomba de vacío para extraer el gas de salida a través de una trampa "fría" o una trampa de purga que contenga Tenax y gel de sílice para efectuar después análisis cromatográficos de gases. La sustancia problema presente en la trampa puede determinarse analíticamente.

El ensayo se lleva a cabo en dos partes. En primer lugar se hacen funcionar las unidades sin lodo pero bombeando al tanque de aireación el agua residual sintética más la sustancia problema. Se toman muestras del afluente, del efluente y del gas de salida, y se analizan para determinar su contenido en sustancia problema durante varios días. A partir de los datos obtenidos, es posible calcular el porcentaje ($R_{vs}$) de sustancia problema eliminado del sistema.

A continuación se efectúa el ensayo biológico normal (con lodo), en condiciones de funcionamiento idénticas a las del estudio de eliminación. También se toman mediciones del COD o de la DQO para comprobar que las unidades funcionan de forma eficiente. Se efectúan análisis ocasionales para determinar la presencia de sustancia problema en el afluente, en el efluente y en el gas de salida de la primera parte del ensayo; tras la aclimatación se efectúan análisis con más frecuencia. También aquí es posible calcular, a partir de los datos del estado de equilibrio, el porcentaje de eliminación de la sustancia problema a partir de la fase líquida mediante todos los procesos ($R_T$) (físicos y biológicos), así como la proporción ($R_V$) eliminada del sistema.

▼**M4**

Cálculo

a) En el ensayo no biológico, es posible calcular el porcentaje ($R_{VP}$) de sustancia problema eliminado del sistema con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

donde:

$R_{VP}$ = eliminación de la sustancia problema por volatilización (%),

$S_{VP}$ = sustancia problema recogida en la trampa, expresada en concentración equivalente de la fase líquida (mg/l),

$S_{IP}$ = concentración de la sustancia problema en el afluente (mg/l).

b) En el ensayo biológico, es posible calcular el porcentaje ($R_V$) de sustancia problema eliminado del sistema con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

donde:

$R_V$ = eliminación de la sustancia problema por volatilización en el ensayo biológico (%),

$S_V$ = sustancia problema recogida en la trampa en el ensayo biológico, expresada en concentración equivalente del afluente líquido (mg/l),

$S_I$ = concentración de la sustancia problema en el afluente (mg/l).

c) En el ensayo biológico, el porcentaje de sustancia problema eliminado por todos los procesos viene dado por la fórmula siguiente:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

donde:

$S_E$ = concentración de la sustancia problema en el efluente (líquido) (mg/l).

d) Así pues, el porcentaje ($R_{BA}$) eliminado por biodegradación más adsorción puede calcularse con ayuda de la fórmula siguiente:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Deben llevarse a cabo ensayos separados para determinar si la sustancia problema se adsorbe; en caso afirmativo, es posible aplicar otra corrección más.

e) La comparación entre la proporción de sustancia problema eliminada de los sistemas de ensayo biológico ($R_v$) y no biológico ($R_{vp}$) indica el efecto general que ha tenido el tratamiento biológico sobre la emisión de la sustancia problema a la atmósfera.

*Ejemplo: Benceno*

Tiempo de retención del lodo = 4 días

Agua residual sintética; tiempo de retención = 8 h

$S_{IP}$ = $S_I$ = 150 mg/l

$S_{VP}$ = 150 mg/l ($S_{EP}$ = 0)

$S_V$ = 22,5 mg/l

$S_E$ = 50 µg/l

▼**M4**

Así pues,

$R_{VP}$ = 100 %, $R_V$ = 15 %

$R_T$ = 100 % y $R_{BA}$ = 85 %.

Se deduce que el benceno no es adsorbido por el lodo.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939-854.

(2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

(3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

(4) ISO 10634 (1995) Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.

(5) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

▼M4

*Apéndice 6*

**Efectos del tiempo de retención del lodo (TRL) para el tratamiento de las sustancias**

INTRODUCCIÓN

1. El método descrito en el texto principal se ideó para determinar si las sustancias objeto del ensayo (generalmente, aquellas de las que se sabe que son intrísecamente biodegradables, pero no fácilmente biodegradables) pueden biodegradarse dentro de los límites impuestos en las depuradoras de aguas residuales. Los resultados se expresan en términos de porcentaje de eliminación y de porcentaje de biodegradación. Las condiciones de funcionamiento de las unidades de lodo activado y la elección del afluente permiten variaciones bastante amplias en la concentración de la sustancia problema en el efluente. Los ensayos se efectúan a una sola concentración nominal o a un solo tiempo nominal de retención del lodo (TRL) y los regímenes de retirada de lodo descritos pueden hacer que el valor del TRL varíe considerablemente tanto de un día a otro como a lo largo de un mismo día.

2. En esta variante (1) (2), el TRL se controla dentro de unos límites mucho más estrechos durante la totalidad de cada período de 24 h (igual que sucede a gran escala), lo que hace que la concentración en los efluentes sea más constante. Se recomienda utilizar agua residual doméstica porque da unos porcentajes de eliminación más constantes y elevados. Asimismo, se investigan los efectos de una serie de valores del TRL y es posible determinar en un estudio más detallado los efectos de una serie de temperaturas sobre la concentración en el efluente.

3. No hay acuerdo general sobre qué modelos cinéticos son aplicables cuando se biodegradan sustancias en las condiciones de la depuración de aguas residuales. Se eligió el modelo de Monod de crecimiento bacteriano y de utilización del sustrato (1) (2) para aplicarlo a los datos recogidos, ya que el método estaba destinado a aplicarse solo a las sustancias producidas en grandes cantidades, lo que lleva a concentraciones superiores a 1 mg/l en las aguas residuales. La validez del modelo simplificado y de las suposiciones aceptadas se estableció utilizando una serie de etoxilatos de alcohol con diversos grados de biodegradabilidad primaria (2) (3).

*Nota:* Esta variante del método sigue muy de cerca el grueso del texto del método de ensayo C.10-A, y a continuación se indican solo los detalles en que difiere.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

4. Se utilizan depósitos porosos de lodo activado, diseñados para facilitar la retirada (casi) continua de mezcla líquida para permitir un control muy preciso del tiempo de retención del lodo (TRL, o $\theta_s$), en modo sin acoplamiento con una serie de TRL y, de forma optativa, con una serie de temperaturas. El tiempo de retención suele ser de 2 a 10 días y la temperatura varía entre 5 y 20 °C. Se introducen en las unidades, por separado, el agua residual, preferentemente de tipo doméstico, y la solución de la sustancia problema, a un caudal que permita alcanzar el tiempo deseado de retención del agua residual (de 3 a 6 horas) y la concentración deseada de sustancia problema en el afluente. Con fines comparativos, se hacen funcionar en paralelo unidades de control sin sustancia problema.

5. Pueden utilizarse otros tipos de aparatos, pero debe ponerse mucha atención para velar por que se consiga un buen control del TRL. Por ejemplo, cuando se utilicen instalaciones que incorporen un sedimentador, puede ser necesario tener en cuenta la pérdida de sólidos a través del efluente de la depuradora. Por otra parte, deben tomarse precauciones especiales para evitar errores debidos a la variación en la cantidad de lodo presente en el sedimentador.

▼M4

6. Las unidades se hacen funcionar bajo cada conjunto seleccionado de condiciones y, una vez alcanzado el equilibrio, se obtienen a lo largo de unas tres semanas las concentraciones medias de la sustancia problema en el estado de equilibrio en los efluentes y, de forma optativa, los valores de COD. Además de evaluar el porcentaje de eliminación de la sustancia problema y, opcionalmente, del COD, debe expresarse de forma gráfica la relación entre las condiciones de funcionamiento de la instalación y la concentración en el efluente. A partir de aquí pueden calcularse constantes cinéticas orientativas y es posible predecir bajo qué condiciones podrá depurarse la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

7. Son aplicables los puntos 12 y 13 del capítulo C.10-A.

UMBRALES

8. Son aplicables los puntos 14 y 15 del capítulo C.10-A.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

9. Es aplicable el punto 16 del capítulo C.10-A.

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

10. Son aplicables los puntos 17 y 18 del capítulo C.10-A.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

11. Una unidad adecuada es la consituida por el sistema del depósito poroso modificado (apéndice 6.1). Consiste en un recipiente interior (o revestimiento) hecho de polipropileno poroso de 3,2 mm de espesor y un diámetro de poro de unos 90 μm, con la junta soldada a tope (de esta manera, la unidad es más sólida que la descrita en el punto 21 del presente capítulo, C.10 A). El revestimiento se introduce en un recipiente exterior de polietileno impermeable, que consiste en dos partes: una base circular en la que se perforan agujeros para alojar dos tubos de aire y un tubo de retirada de lodo, y un cilindro superior que se atornilla a la base y que tiene una salida situada de forma que pase un volumen conocido (3 l) al recipiente del depósito poroso. Uno de los tubos de aire está provisto de una piedra difusora y el otro tiene el extremo abierto y está colocado en ángulo recto respecto a la piedra del depósito. Este sistema produce la turbulencia necesaria para garantizar que el contenido del depósito se mezcla completamente, y que la concentración de oxígeno disuelto es > 2 mg/l.

12. Se mantiene el número adecuado de unidades a una temperatura controlada en el rango de 5 a 20 °C (± 1 °C), bien en baño de agua o bien en salas de temperatura constante. Se requieren bombas que introduzcan en los recipientes de aireación la solución de la sustancia problema y el lodo sedimentado, al caudal necesario (0-1,0 ml/min y 0-25 ml/min, respectivamente), y una tercera bomba que elimine el lodo residual de los recipientes de aireación. El caudal necesario, que debe ser muy bajo, de lodo residual se consigue con una bomba regulada a un caudal superior y que funcione de forma intermitente por medio de un temporizador que la active, por ejemplo, durante 10 s cada minuto, si el caudal de la bomba es de 3 ml/min, lo que da un caudal de retirada de lodo de 0,5 ml/min.

*Equipo de filtración o centrífuga*

13. Es aplicable el punto 23 del capítulo C10-A.

*Equipo analítico*

14. Es aplicable el punto 24 del capítulo C.10-A.

*Agua*

▼**M4**

15. Son aplicables los puntos 25 y 26 del capítulo C.10-A.

*Medio orgánico*

16. Es aplicable el punto 27 del capítulo C.10-A.

*Agua residual sintética*

17. Es aplicable el punto 28 del capítulo C.10-A.

*Agua residual doméstica*

18. Es aplicable el punto 29 del capítulo C.10-A.

*Lodo activado*

19. Es aplicable el punto 30 del capítulo C10-A.

*Soluciones madre de sustancia problema*

20. Son aplicables los puntos 31 y 32 del capítulo C.10-A.

PROCEDIMIENTO

*Preparación del inóculo*

21. Es aplicable solamente el punto 34 del capítulo C.10-A. Utilícese lodo activado (con una concentración en torno a 2,5 g/l).

*Número de unidades de ensayo*

22. Para un ensayo sencillo, es decir, para medir el porcentaje de eliminación, solo se necesita un único TRL, pero para conseguir los datos necesarios para calcular las constantes cinéticas orientativas hacen falta 4 o 5 valores de TRL. Generalmente se eligen valores de entre 2 y 10 días. En la práctica, es conveniente efectuar el ensayo con 4 o 5 TRL simultáneamente a una única temperatura; en estudios ampliados se utilizan los mismos valores de TRL, o quizá una gama diferente de valores, pero a otras temperaturas en el rango de 5 a 20 °C. Para la degradación primaria (uso principal), normalmente solo es necesaria una unidad por conjunto de condiciones. Sin embargo, para estudiar la biodegradabilidad final hay que disponer de una unidad de control, con cada conjunto de condiciones, que reciba el agua residual pero no la sustancia problema. Si se piensa que la sustancia problema se encuentra en el agua residual utilizada, será necesario utilizar unidades de control cuando se haga la evaluación de la biodegradación primaria, y aplicar las correcciones pertinentes en los cálculos.

*Introducción del medio orgánico y de la sustancia problema*

23. Aplíquense los puntos 36 a 39 del capítulo C.10-A, pero obsérvese que la solución de sustancia problema se introduce aparte y que se utilizan diversas proporciones de retirada de lodo. Debe procederse a medir y ajustar, en caso necesario, en una banda de ± 10 %, los caudales de los afluentes, efluentes y lodo retirado, con frecuencia, por ejemplo, dos veces al día. Si se encuentran dificultades en los métodos analíticos cuando se utiliza agua residual doméstica, efectúese el ensayo con agua residual sintética, pero asegurándose de que los medios diferentes proporcionan datos cinéticos comparables.

*Manipulación de las unidades de lodo activado*

24. Son aplicables los puntos 40 a 43 del capítulo C.10-A, pero hay que controlar el TRL solamente por medio de la retirada "constante" de lodo.

*Muestreo y análisis*

25. Son aplicables los puntos 44 a 50 del capítulo C.10-A, salvo que aquí debe determinarse la concentración de la sustancia problema y es opcional la determinación del COD; no debe utilizarse la DQO.

▼M4

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

26. Son aplicables los puntos 52 a 54 del capítulo C.10-A.

**Expresión de los resultados del ensayo**

27. Son aplicables los puntos 56 a 62 del capítulo C.10-A.

**Cálculo de las constantes cinéticas**

28. Es más realista indicar la concentración media de la sustancia problema en el estado de equilibrio en el efluente y describir cómo varía en función de las condiciones de funcionamiento de la instalación, en lugar de indicar el porcentaje de biodegradación primaria. Puede hacerse atendiendo a la ecuación (6) del apéndice 6.2, con la que se pueden obtener valores de $K_S$, $\mu_m$ y $\theta_{SC}$, que es el tiempo crítico de retención de lodo.

[Otra posibilidad consiste en obtener valores aproximados de $K_S$ y μm utilizando un sencillo programa informático para ajustar a los valores experimentales obtenidos la curva teórica calculada a partir de la ecuación 2 (apéndice 6.2). Aunque las eventuales soluciones dadas no serán únicas, puede obtenerse una aproximación razonable de $K_S$ y $\mu_m$].

**Variabilidad de los resultados**

29. Es una experiencia común obtener valores variables de los parámetros cinéticos para las distintas sustancias. Se piensa que en los valores resultantes influyen mucho las condiciones en las que se ha formado el lodo, así como las condiciones reinantes durante el ensayo efectuado (como en el punto 5 y en otros ensayos). Grady *et al.* (4) han discutido un aspecto de esta variabilidad y han sugerido que los términos "existente" e "intrínseca" deben aplicarse a dos situaciones extremas que representan los límites del estado fisiológico que un cultivo puede alcanzar durante un experimento cinético. Si no se permite que cambie el estado durante el ensayo, los valores de los parámetros cinéticos reflejan las condiciones del ambiente del que se han tomado los microorganismos; estos valores se denominan "existentes" o presentes en el momento. Al otro extremo, si las condiciones del ensayo son tales que permiten el pleno desarrollo del sistema de síntesis de proteínas y así alcanzar la tasa de crecimiento más elevada posible, los parámetros cinéticos obtenidos se denominan "intrínsecos", y solo dependen de la naturaleza del sustrato y de los tipos de bacterias del cultivo. Como referencia, se obtendrán valores existentes manteniendo baja la proporción de concentración del sustrato respecto a los microorganismos competentes ($S_o/X_o$), por ejemplo 0,025, y los valores intrínsecos aparecen cuando la proporción es elevada, es decir, de al menos 20. En ambos casos, $S_o$ debe igualar o superar al valor pertinente de Ks, la constante de semisaturación.

30. En un reciente taller de la SETAC (5) se discutieron la variabilidad y otras facetas de la cinética de la biodegradación. De tales estudios, tanto de los ya publicados como de los que aún están en fase de proyecto, debe obtenerse una visión más clara de la cinética de las depuradoras, a fin de permitir una mejor interpretación de los datos disponibles, y para sugerir mejoras de los futuros métodos de ensayo.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornadas Com. Español. Deterg.: 33-48.

(2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340-343.

(3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411-422.

▼**M4**

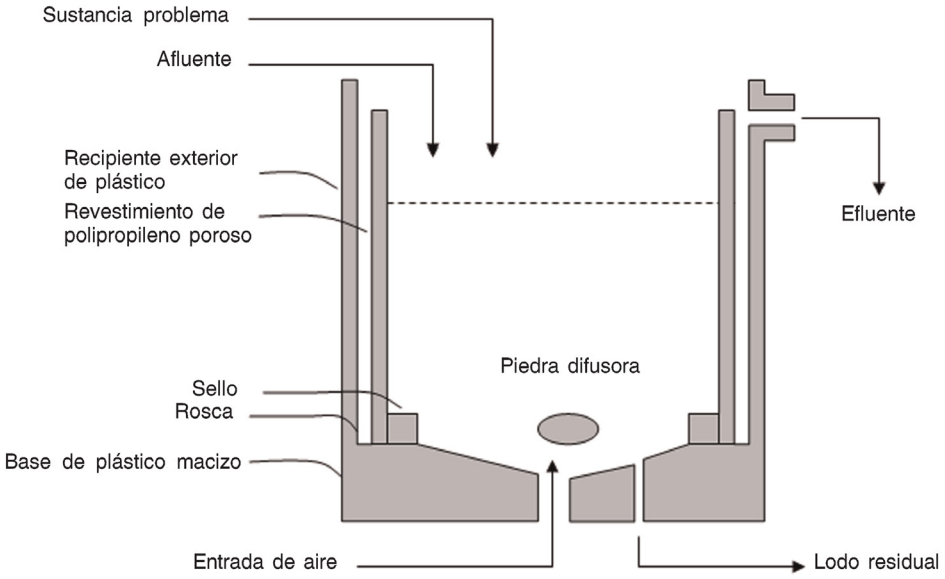
(4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742-748.

(5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼**M4**

*Apéndice 6.1*

**Depósito poroso con control del TRL**



▼M4

*Apéndice 6.2*

**Cálculo de las constantes cinéticas**

1. Aceptando que se aplica la cinética de Monod y considerando un balance de masas de sólidos activos y de sustrato en todo el sistema de lodo activado (1), pueden obtenerse las siguientes expresiones del estado de equilibrio:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

o

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

donde:

$S_1$ = concentración de sustrato en el efluente (mg/l)

$K_S$ = constante de semisaturación, concentración a la que $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

$\mu$ = tasa de crecimiento específico ($d^{-1}$)

$\mu_m$ = valor máximo de $\mu_m$ ($d^{-1}$)

$K_d$ = tasa de degradación específica de los sólidos activos ($d^{-1}$)

$\theta_S$ = tiempo medio de retención del lodo, TRL (d)

Del examen de esta ecuación se deducen las conclusiones siguientes:

i) la concentración del efluente es independiente de la del afluente ($S_0$); por tanto, el porcentaje de biodegradación varía con la concentración del afluente, $S_0$,

ii) el único parámetro de control de la instalación que afecta a $S_1$ es el tiempo de retención del lodo, $\theta_S$,

iii) para una concentración dada en el afluente, $S_0$, habrá un tiempo crítico de retención del lodo tal que:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

donde:

$\theta_{SC}$ = tiempo crítico de retención del lodo, por debajo del cual los microorganismos competentes serán arrastrados fuera de la instalación,

iv) dado que los demás parámetros de la ecuación (2) están asociados con la cinética de crecimiento, es probable que la temperatura afecte al nivel del sustrato del efluente y a la edad crítica del lodo, es decir, el tiempo de retención del lodo necesario para obtener cierto grado de depuración aumentará según descienda la temperatura.

2. A partir del balance de masas de sólidos en el sistema del depósito poroso, y aceptando que la concentración de sólidos en el efluente de la instalación, $X_2$, es baja respecto a la del recipiente de aireación, $X_1$, el tiempo de retención del lodo es:

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

y

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

donde:

$V$ = volumen del recipiente de aireación (l)

$X_1$ = concentración de sólidos en el recipiente de aireación (mg/l)

$X_2$ = concentración de sólidos en el efluente (mg/l)

$Q_0$ = caudal del afluente (l/d)

$Q_1$ = caudal del lodo residual (l/d).

Así pues, es posible fijar el tiempo de retención del lodo a cualquier valor preseleccionado mediante el control del caudal del lodo residual, $Q_1$.

Conclusiones:

3. En consecuencia, el objetivo principal del ensayo consiste en poder prever la concentración del efluente y, por tanto, los niveles de sustancia problema en las aguas receptoras.

4. Mediante la representación gráfica de $S_1$ frente a $\theta_S$, a veces puede evaluarse fácilmente el tiempo crítico de retención del lodo, $\theta_{SC}$; véase por ejemplo la curva 3 de la figura 1. Cuando esto no es posible, se puede calcular $\theta_{SC}$, junto con los valores aproximados de $\mu_m$ y $K_S$, representando $S_1$ frente a $S_1 \bullet \theta_S$.

Una reordenación de la ecuación (1) da el resultado siguiente:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Si $K_d$ es pequeña, entonces $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ y [5] se convierte en lo siguiente:

$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Así pues, la gráfica deberá ser una línea recta (véase la figura 2) de pendiente $1/\mu_m$ y ordenada en el origen $K_S/\mu_m$; también $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

*Figura 1*

**Tres temperaturas; cinco TRL**

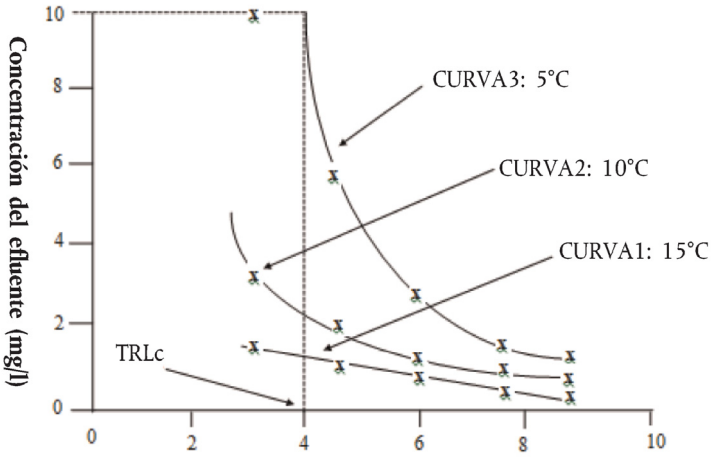
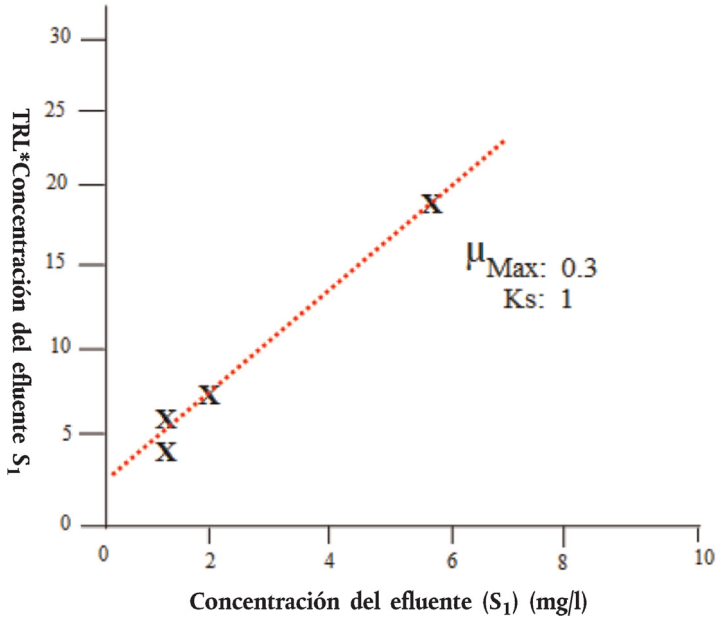



*Figura 2*

**Recta de regresión TRL · $S_1$ frente a $S_1$ a T = 5 °C**




*Glosario:*

TRL

Concentración del efluente

▼M4

*Apéndice 7*

ENSAYO CON UN RANGO DE CONCENTRACIONES BAJAS (µg/l)

1. En el medio acuático suele haber muchas sustancias presentes, incluso en las aguas residuales, a concentraciones muy bajas (µg/l). A tales concentraciones, no es probable que sirvan de sustratos primarios que permitan el crecimiento, pero es más probable que se degraden como sustratos secundarios, no responsables del crecimiento, en paralelo con otras diversas sustancias carbonadas presentes de forma natural. Por tanto, la degradación de tales sustancias no se ajustará al modelo descrito en el apéndice 6. Hay muchos modelos que podrían aplicarse y, bajo las condiciones reinantes en los sistemas de depuración de aguas residuales, podrían estar operativos simultáneamente más de uno. Es mucha la investigación que ha de hacerse todavía para poder resolver este problema.

2. Mientras tanto, puede seguirse el procedimiento indicado en el texto principal (capítulo C.10-A), pero solo en relación con la biodegradabilidad primaria, utilizando concentraciones suficientemente bajas (< 100 µg/l) y un procedimiento analítico validado. Puede calcularse el porcentaje de biodegradación (véase el punto 54 del método de ensayo) siempre que se tengan en cuenta los eventuales procesos abióticos (adsorción, volatilidad, etc.). Puede citarse como ejemplo el estudio de Nyholm y sus asociados (1) (2), con un ciclo de 4 h en un sistema de llenado y recogida. Calcularon constantes de pseudoprimer orden respecto a 5 sustancias añadidas a un agua residual a concentraciones entre 5 y 100 µg/l. Para la biodegradabilidad final, pueden utilizarse sustancias marcadas con $^{14}C$. Queda fuera del ámbito del presente método de ensayo recoger una descripción de esta posibilidad, ya que por ahora no se dispone de procedimientos aprobados, aunque un método propuesto para la norma ISO 14592 (3) contiene orientaciones sobre el uso de sustancias marcadas con $^{14}C$.

**Prueba LASC**

3. Después se propuso un ensayo más simple en dos etapas (4) (5) (6); el método del lodo activado semicontinuo (LASC) va seguido por ensayos cinéticos a corto plazo con muestras tomadas de las unidades de LASC. El sistema LASC funciona con tasas conocidas de retirada de lodo (a diferencia del método de ensayo C.12 original) y se alimenta con agua residual sintética de la OCDE modificada o con agua residual doméstica. El agua residual sintética se modificó (debido a que el valor de pH variaba y a que la capacidad de sedimentación del lodo era baja) por la adición de fosfato como amortiguador, extracto de levadura, cloruro de hierro (III) y sales de oligoelementos, y se aumentó su DQO hasta alrededor de 750 mg/l por la elevación de la concentración de peptona y extracto de carne. Las unidades funcionaban en ciclos de 24 h: aireación durante 23 h, retirada del lodo, sedimentación, retirada del sobrenadante (efluente) seguida de la adición del agua residual sintética más la sustancia problema, hasta 100 µg/l, (es decir, a la misma concentración aproximadamente que en el ensayo a corto plazo). Una vez por semana, el 10 % del lodo total se sustituye con lodo nuevo a fin de mantener la población microbiana en equilibrio.

4. Se miden las concentraciones de la sustancia problema al inicio y al final de la aireación, y el ensayo prosigue hasta que se estabilice la eliminación de la sustancia problema; esto puede necesitar desde una semana hasta varios meses.

**Ensayo a corto plazo**

5. Se lleva a cabo un ensayo a corto plazo (por ejemplo, 8 horas) para determinar la constante cinética de velocidad de (pseudo) primer orden de la degradación de la sustancia problema en lodo activado de orígenes e historiales conocidos pero diferentes. En particular, se toman muestras de lodo de los reactores LASC —al final de un período de aireación cuando la concentración de sustrato orgánico es baja— durante la realización de un experimento de aclimatación (puntos 3, 4). También puede tomarse lodo de una unidad paralela de LASC no expuesta a la sustancia problema, con fines comparativos. Se

▼M4

airean las mezclas de lodo y de sustancia problema añadida a dos o más concentraciones en el rango de 1-50 μg/l, sin adición de agua residual sintética ni otro sustrato orgánico. Se determina el contenido de sustancia problema que queda en disolución a intervalos periódicos como, por ejemplo, cada hora, en función de la degradabilidad de la sustancia, durante no más de 24 h. Se centrifugan las muestras antes de someterlas a un análisis adecuado.

**Cálculos**

6. Los datos de las unidades LASC se utilizan para calcular el porcentaje de eliminación de la sustancia problema (punto 54). Asimismo es posible calcular la constante media de velocidad, $K_1$, (normalizada para tener en cuenta la concentración de sólidos en suspensión) con ayuda de la ecuación siguiente:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

donde:

t = tiempo de aireación (23 h)

$C_e$ = concentración al final del período de aireación (μg/l)

$C_i$ = concentración al inicio de la aireación (μg/l)

SS = concentración de sólidos en el lodo activado (mg/l)

7. En el ensayo a corto plazo, se representa frente al tiempo el log del porcentaje de la concentración restante, y la pendiente de la parte inicial (degradación del 10-50 %) de la gráfica es equivalente a $K_1$, la constante de (pseudo) primer orden. La constante se normaliza respecto a la concentración de sólidos en el lodo dividiendo la pendiente por la concentración de sólidos en el lodo. El resultado comunicado debe incluir asimismo datos de las concentraciones iniciales de la sustancia problema y de los sólidos en suspensión, tiempo de retención del lodo, carga y origen del lodo, así como datos de la eventual exposición previa a la sustancia problema.

**Variabilidad de los resultados**

8. En un reciente taller de la SETAC (7) se discutieron la variabilidad y otras facetas de la cinética de la biodegradación. De tales estudios, tanto de los ya publicados como de los que aún están en fase de proyecto, debe obtenerse una visión más clara de la cinética de las depuradoras, a fin de permitir una mejor interpretación de los datos disponibles, y para sugerir mejoras de los futuros métodos de ensayo.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339-353.

(2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505-1510.

(3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia de compuestos orgánicos a baja concentración en el agua.

▼**M4**

(4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851-864.

(5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and estándar (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711-735.

(6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.

(7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼M4

## C.10-B: Biopelículas

INTRODUCCIÓN

1. Los ensayos de simulación se aplican normalmente a sustancias que no han superado un ensayo exploratorio de la biodegradabilidad fácil [(capítulo C.4-A a F del presente anexo (9)], pero sí han pasado un ensayo de biodegradabilidad intrínseca. Con carácter excepcional, también se aplican los ensayos de simulación a cualquier sustancia de la que se requiera más información, especialmente sustancias comercializadas en grandes cantidades, y normalmente se aplica el ensayo del lodo activado (C.10-A). Sin embargo, en ciertas circunstancias, es necesario conseguir información específica relativa al comportamiento de una sustancia ante métodos de depuración de aguas residuales con participación de biopelículas: filtros percoladores o por goteo, biodiscos giratorios, lechos fluidizados. Se han diseñado diversos dispositivos para satisfacer esta necesidad.

2. Gerike *et al.* (1) han utilizado grandes filtros por goteo de laboratorio, en modo de acoplamiento. Estos filtros ocupaban mucho espacio y necsitaban volúmenes relativamente grandes de agua residual natural o sintética. Truesdale *et al.* (2) han descrito filtros más pequeños (6 pies × 6 pulgadas de diámetro) que aceptaban aguas residuales naturales exentas de agentes tensioactivos, pero seguían necesitando volúmenes bastante grandes. Para que se formara una biopelícula "madura" hacían falta hasta 14 semanas, y se necesitaba un plazo adicional de 4-8 semanas tras la primera introducción del agente tensioactivo antes de que se realizara la aclimatación.

3. Baumann *et al.* (3) han desarrollado un filtro mucho más pequeño utilizando "lana" de poliéster previamente remojada en lodo activado como medio inerte de soporte de la biopelícula. Se utilizaba como única fuente de carbono la sustancia problema, y se evaluaba la biodegradabilidad a partir de mediciones del carbono orgánico disuelto (COD) en el afluente y en el efluente, y de la cantidad de $CO_2$ en el gas de salida.

4. Gloyna *et al.* (4), aplicando un enfoque bastante diferente, inventaron el reactor tubular giratorio. Sobre la superficie interna del tubo giratorio se cultivaba una biopelícula sobre un área conocida pasando el afluente introducido por la parte superior del tubo, que se encontraba inclinado ligeramente respecto a la horizontal. Este reactor se ha utilizado para estudiar la biodegradabilidad de los tensioactivos (5), y también para investigar el espesor óptimo de la biopelícula y la difusión a través de la película (6). Estos últimos autores han seguido desarrollando el reactor, incluso modificándolo para que pueda determinarse el $CO_2$ en el gas de salida.

5. El Standing Committee of Analysts (Comité Permanente de Analistas del Reino Unido) ha adoptado el reactor tubular giratorio como método normal para evaluar tanto la biodegradabilidad de las sustancias (7) como la posibilidad de tratar las aguas residuales y su toxicidad (8). El método aquí descrito reúne las ventajas de ser simple, compacto y reproducible y de necesitar un volumen relativamente reducido de medio orgánico.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. A la superficie interna de un tubo inclinado que gira lentamente se aplica agua residual sintética o doméstica, y la sustancia problema, mezclada o sola. En esa superficie interna se forma una capa de microorganismos, similar a las presentes en los medios de los biofiltros. Las condiciones de trabajo del reactor se eligen de manera que permitan la eliminación adecuada de la materia orgánica y, cuando sea necesario, la oxidación del amonio.

▼M4

7. Se recoge el efluente del tubo y se sedimenta y/o se filtra antes de analizarlo para determinar la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) y/o la de la sustancia problema mediante un método específico. Con fines comparativos, se hacen funcionar en paralelo y bajo las mismas condiciones unidades de control sin sustancia problema. Se acepta que la diferencia entre las concentraciones de COD en los efluentes de las unidades de ensayo y de control se debe a la sustancia problema y a sus metabolitos orgánicos. Para calcular la eliminación de la sustancia problema, se compara esta diferencia con la concentración de la sustancia problema añadida (como COD).

8. Normalmente puede distinguirse la biodegradación de la bioadsorción examinando atentamente la curva de la eliminación frente al tiempo. Generalmente puede confirmarse aplicando el ensayo de biodegradación fácil (consumo de oxígeno o producción de dióxido de carbono) con un inóculo aclimatado, tomado al final del ensayo de los reactores que reciben la sustancia problema.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

9. Es necesario conocer las características de pureza, hidrosolubilidad, volatilidad y adsorción de la sustancia problema para poder interpretar correctamente los resultados.

10. Normalmente no es posible hacer el ensayo con sustancias volátiles y poco solubles, salvo que se adopten precauciones especiales (véase el apéndice 5 del capítulo C.10-A). También debe conocerse la estructura química, o al menos la fórmula empírica, para poder calcular los valores teóricos o comprobar los valores medidos de ciertos parámetros, como la demanda teórica de oxígeno (DTO) o el COD.

11. El disponer de datos sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos (véase el apéndice 4 del capítulo C.10-A) puede ser útil para seleccionar las concentraciones adecuadas para el ensayo y puede ser fundamental para interpretar correctamente los valores bajos de biodegradación.

UMBRALES

12. Originalmente se exigía que la biodegradación primaria de tensioactivos llegara como mínimo al 80 % para poder comercializar la sustancia. Si no se alcanza el valor del 80 %, puede aplicarse este ensayo (confirmatorio) de simulación y el tensioactivo puede comercializarse solamente si se elimina más del 90 % de la sustancia específica. Con las sustancias en general, no se trata de pasar un umbral sino de que el valor de eliminación porcentual pueda utilizarse para calcular aproximadamente la concentración probable en el medio ambiente que deba utilizarse en la evaluación del peligro planteado por las sustancias. En una serie de estudios de sustancias puras, se observó que el porcentaje de eliminación del COD era > 90 % en más de las tres cuartas partes, y > 80 % en más del 90 %, de las sustancias que mostraban un grado significativo de biodegradabilidad.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

13. Para asegurarse de la correcta ejecución del procedimiento experimental, es conveniente someter ocasionalmente a ensayo sustancias de referencia cuyo comportamiento se conozca. Entre esas sustancias se cuentan el ácido adípico, el 2-fenil-fenol, el 1-naftol, el ácido difénico y el ácido 1-naftoico.

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

14. Un laboratorio del Reino Unido dedujo que la desviación típica relativa era del 3,5 % dentro de un ensayo y del 5 % entre ensayos (7).

▼**M4**

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

*Reactores tubulares giratorios*

15. El dispositivo (véanse las figuras 1 y 2 del apéndice 8) consiste en un banco de tubos acrílicos, cada uno de los cuales mide 30,5 cm de longitud y 5 cm de diámetro interior, apoyado en ruedas con borde de caucho, con un marco metálico de soporte. Cada tubo tiene una pestaña exterior, de unos 0,5 cm de profundidad, para mantenerlo sobre las ruedas, la superficie interior se ha hecho rugosa con lana de acero basta, y hay una pestaña interior de 0,5 cm de profundidad en el extremo superior (de alimentación) para retener el líquido. Los tubos presentan una inclinación de un grado aproximadamente respecto a la horizontal para conseguir el tiempo de contacto necesario cuando se aplica el medio de ensayo a un tubo limpio. Las ruedas con borde de caucho se hacen girar mediante un motor de velocidad lenta y variable. La temperatura de los tubos está controlada por su instalación en una zona de temperatura constante.

16. Si se encierra cada reactor de tubos dentro de un tubo taponado, ligeramente mayor, y se vela por que las conexiones sean estancas, es posible recoger el $CO_2$ de salida en una solución alcalina para su medición posterior (6).

17. En un recipiente de almacenamiento de 20 l se pone el suministro de 24 h, para cada tubo, de medio orgánico con la sustancia problema añadida, en su caso (A) (véase la figura 2). Cuando sea necesario, se podrá añadir aparte la solución de la sustancia problema. Cerca del fondo de cada recipiente de almacenamiento hay una salida conectada mediante los tubos adecuados (por ejemplo, de caucho de silicona) a través de una bomba peristáltica a un tubo de alimentación acrílico o de vidrio que se introduce 2-4 cm en el extremo superior (alimentación) del tubo inclinado (C). Se deja que el efluente gotee desde el extremo inferior del tubo inclinado para recogerse en otro recipiente de almacenamiento (D). El efluente se somete a sedimentación o filtración antes de proceder a su análisis.

*Equipo de filtración y centrífuga*

18. Dispositivo de filtración de muestras con filtros de membrana de porosidad adecuada (diámetro de abertura nominal de 0,45 μm) que adsorban sustancias orgánicas solubles o liberen carbono orgánico en un grado mínimo. Si se utilizan filtros que liberan carbono orgánico, lavarlos cuidadosamente con agua caliente para eliminar el carbono orgánico lixiviable. Otra posibilidad es utilizar una centrífuga que pueda alcanzar una aceleración de 40 000 $m/s^2$.

19. Equipo analítico para determinar:

— el COD, el carbono orgánico total (COT), o la demanda química de oxígeno (DQO),

— la sustancia específica (por HPLC, CG, etc.), cuando sea necesario,

— pH, temperatura, acidez, alcalinidad,

— amonio, nitrito y nitrato, si los ensayos se efectúan en condiciones de nitrificación.

*Agua*

20. Agua del grifo, con menos de 3 mg/l de COD.

21. Agua destilada o desionizada, con menos de 2 mg/l de COD.

▼M4

*Medio orgánico*

22. Como medio orgánico puede utilizarse agua residual sintética, agua residual doméstica o una mezcla de ambos tipos. Se ha observado que el uso de agua residual doméstica sola suele llevar a un mayor porcentaje de eliminación del COD (en las unidades de lodo activado) y que incluso permite la biodegradación de algunas sustancias que no se biodegradan cuando se utiliza el agua residual sintética de la OCDE. Así pues, se recomienda el uso de agua residual doméstica. Debe medirse la concentración de COD (o de DQO) en cada nuevo lote de medio orgánico. Es necesario conocer la acidez o la alcalinidad del medio orgánico. Es posible que el medio orgánico requiera la adición de un amortiguador adecuado (carbonato de hidrógeno y sodio, o fosfato de hidrógeno y potasio) si es baja su acidez o su alcalinidad, para mantener durante el ensayo un pH de alrededor de 7,5 ± 0,5 en el reactor. Debe decidirse en cada caso la cantidad de amortiguador que ha de añadirse, y en qué momento hacerlo.

*Agua residual sintética*

23. Disuélvase en cada litro de agua del grifo: peptona, 160 mg; extracto de carne, 110 mg; urea, 30 mg; fosfato de hidrógeno y dipotasio anhidro ($K_2HPO_4$), 28 mg; cloruro de sodio (NaCl), 7 mg; cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$), 4 mg; sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$), 2 mg. El agua residual sintética de la OCDE es un ejemplo y da una concentración media de COD en el afluente de unos 100 mg/l. También es posible utilizar otras composiciones, con la misma concentración aproximada de COD, que se acerquen más al agua residual real. El agua residual sintética puede elaborarse con agua destilada en forma concentrada y conservarse a alrededor de 1 °C durante una semana como máximo. En el momento en que se necesite, se diluye con agua del grifo. (Este medio no es satisfactorio: la concentración de nitrógeno es muy elevada y el contenido de carbono es relativamente bajo, por ejemplo, pero no se ha sugerido nada mejor, salvo añadir más fosfato como amortiguador y peptona adicional.)

*Agua residual doméstica*

24. Debe utilizarse agua residual recién decantada, recogida cada día en una depuradora que reciba predominantemente agua residual doméstica. Debe recogerse del canal del rebosadero del tanque de sedimentación primaria, o de la alimentación a la instalación de lodo activado, y encontrarse exenta en gran medida de partículas gruesas. El agua residual puede seguir utilizándose tras guardarse varios días a unos 4 °C, si se demuestra que el COD (o la DQO) no ha descendido de forma significativa (es decir, en menos del 20 %) en ese plazo. A fin de limitar las perturbaciones del sistema, el COD (o la DQO) de cada lote nuevo debe ajustarse a un nivel constante adecuado, antes de utilizarlo, por ejemplo, mediante dilución con agua del grifo.

*Lubricante*

25. Puede aplicarse glicerol o aceite de oliva para lubricar los rodillos de la bomba peristáltica: ambos productos son adecuados para utilizarse con tubos de caucho de silicona.

*Soluciones madre de sustancia problema*

26. Con sustancias de solubilidad adecuada, preparar soluciones madre a concentraciones apropiadas (por ejemplo, de 1 a 5 g/l) en agua desionizada, o en la porción mineral del agua residual sintética. Respecto a las sustancias insolubles, véase el apéndice 5 del capítulo C.10-A. Este método no es adecuado para las sustancias volátiles si no se modifican los reactores tubulares (punto 16). Hay que determinar el COD y el COT de la solución madre y repetir las

▼M4

mediciones con cada lote nuevo. Si la diferencia entre el COD y el COT es superior al 20 %, ha de comprobarse la hidrosolubilidad de la sustancia problema. Comparar con los valores nominales el COD o la concentración de la sustancia problema medida por análisis específico de la solución madre, para considerar si la recuperación es suficientemente buena (normalmente puede esperarse > 90 %). Ha de evaluarse, especialmente en el caso de las dispersiones, si el COD puede utilizarse como parámetro analítico o si solo es posible utilizar una técnica analítica específica de la sustancia problema. En el caso de las dispersiones es necesario centrifugar las muestras. Con cada lote nuevo hay que medir el COD, la DQO o la sustancia mediante análisis específico.

27. Determínese el pH de la solución madre. La presencia de valores extremos indica que la adición de la sustancia puede influir en el pH de lodo activado en el sistema de ensayo. En este caso, haya que neutralizar la solución madre para obtener un pH de 7 ± 0,5, utilizando pequeñas cantidades de ácidos o bases inorgánicos, pero evitando la precipitación de la sustancia problema.

PROCEDIMIENTO

*Preparación del medio orgánico para su introducción*

28. Hay que asegurarse de que todos los recipientes del afluente y del efluente, así como los tubos que los unen, se limpian a fondo para eliminar la eventual proliferación microbiana, tanto al principio como a lo largo del ensayo.

29. Prepárese el agua residual sintética (punto 23) cada día de nuevo, bien a partir de los sólidos o bien a partir de la solución madre concentrada mediante la dilución adecuada con agua del grifo. Mídase la cantidad necesaria con una probeta y añádase a un recipiente de afluente limpio. También, cuando sea necesario, añádase al agua residual sintética, antes de la dilución, la cantidad necesaria de solución madre de la sustancia problema o de la sustancia de referencia. Si es más conveniente o necesario para evitar pérdidas de la sustancia problema, prepárese una solución diluida aparte de la sustancia problema en un depósito aparte y añádase a los tubos inclinados mediante una bomba dosificadora diferente.

30. Otra posibilidad, preferible, es utilizar agua residual doméstica decantada (punto 24), recogida de nuevo cada día, cuando sea posible.

*Funcionamiento de los reactores tubulares giratorios*

31. Para la evaluación de una sola sustancia problema, hacen falta dos reactores tubulares idénticos montados en una sala de temperatura constante, normalmente a 22 ± 2 °C.

32. Ajústense las bombas peristálticas para que lleven un caudal de 250 ± 25 ml/h de medio orgánico (sin la sustancia problema) a los tubos inclinados, que giran a 18 ± 2 rpm. Aplíquese el lubricante (punto 25) a los tubos de la bomba al inicio y periódicamente a lo largo del ensayo, para conseguir un funcionamiento adecuado y prolongar la vida de los tubos.

33. Ajústese el ángulo de inclinación de los tubos respecto a la horizontal para conseguir un tiempo de residencia de 125 ± 12,5 s de la alimentación en un tubo limpio. Estímese el tiempo de retención añadiendo a la alimentación un marcador no biológico (por ejemplo, NaCl, un colorante inerte): se acepta que el tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima en el efluente es el tiempo medio de retención (cuando la película es máxima, el tiempo de retención puede aumentar hasta unos 30 min).

34. Se ha comprobado que estas tasas, velocidades y tiempos proporcionan retiradas adecuadas (> 80 %) del COD (o de la DQO) y producen efluentes nitrificados. La velocidad de flujo debe modificarse si la eliminación es insuficiente o si ha de simularse el comportamiento de una depuradora particular. En este último caso, ajústese la proporción de medio orgánico introducido hasta que el comportamiento del reactor se alinee con el de la depuradora.

▼M4

*Inoculación*

35. La inoculación aérea puede ser suficiente para iniciar el crecimiento de los microorganismos cuando se utiliza agua residual sintética; en caso contrario, añádase a la alimentación durante 3 días 1 ml/l de agua residual decantada.

*Mediciones*

36. A intervalos periódicos, compruébese que las dosis de introducción de material y velocidades de giro se ajustan a los límites requeridos. Asimismo, mídase el pH del efluente, especialmente si se espera que haya nitrificación.

*Muestreo y análisis*

37. El método, la pauta y la frecuencia del muestreo deben elegirse de manera que se ajusten al propósito del ensayo. Por ejemplo, tómense muestras instantáneas de afluente y de efluente, o bien recójanse muestras a lo largo de un período más largo (por ejemplo, de 3 a 6 h). En el primer período, sin sustancia problema, tómense muestras dos veces por semana. Fíltrense las muestras por membrana o centrifúguense a alrededor de 40 000 $m/s^2$ durante unos 15 min (punto 18). Puede ser necesario sedimentar las muestras y/o pasarlas por un filtro grueso antes de proceder a la filtración por membrana. Determínese el COD (o la DQO) al menos por duplicado y, en caso necesario, la DBO y el contenido de amonio y de nitrito/nitrato.

38. Todos los análisis deben efectuarse lo antes posible tras la recogida y preparación de las muestras. Si resulta necesario retrasar un análisis, las muestras deben conservarse a unos 4 °C a oscuras, en frascos llenos y bien cerrados. Si es necesario almacenar las muestras durante más de 48 h, hay que conservarlas por congelación, por acidificación o por adición de una sustancia tóxica adecuada [por ejemplo, 20 ml/l de una solución de cloruro de mercurio (II) de 10 g/l]. Hay que verificar que la técnica de conservación no altera los resultados de los análisis.

*Período de rodaje*

39. En este período, la biopelícula superficial crece hasta alcanzar un espesor óptimo, lo que generalmente necesita unas 2 semanas y no debe superar las 6 semanas. La eliminación de COD (o de DQO) (punto 44) va aumentando hasta alcanzar un valor de meseta. Una vez alcanzada la meseta con un valor similar en ambos tubos, se selecciona uno de ellos como control para el resto del ensayo, durante el cual su comportamiento debe mantenerse constante.

*Introducción de la sustancia problema*

40. Añádase en este momento la sustancia problema al otro reactor, a la concentración requerida, generalmente de 10 a 20 mg C/l. El control sigue recibiendo solamente el medio orgánico.

*Período de aclimatación*

41. Continúese haciendo los análisis del COD (o de la DQO) dos veces por semana y, si hay que evaluar la biodegradabilidad primaria, mídase también la concentración de la sustancia problema mediante un análisis específico. Déjese de 1 a 6 semanas (o incluso más en condiciones especiales) una vez añadida por primera vez la sustancia problema, para permitir que se dé la aclimatación. Cuando el porcentaje de eliminación (puntos 43 a 45) alcance el valor máximo, obténganse de 12 a 15 valores válidos en la fase de meseta a lo largo de unas 3 semanas, para evaluar el porcentaje medio de eliminación. Se considera que el ensayo está completado si se alcanza un nivel suficientemente elevado de eliminación. Normalmente, no debe llegarse a una duración del ensayo superior a 12 semanas tras la primera adición de la sustancia problema.

▼M4

*Arranque de la película*

42. A intervalos relativamente periódicos, se produce la brusca eliminación de grandes cantidades del excedente de película de los tubos, o "arranque". Para garantizar que esto no afecta a la comparabilidad de los resultados, permítase que los ensayos abarquen al menos dos ciclos completos de crecimiento y de arranque.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

43. Calcúlese el porcentaje de eliminación de la sustancia problema en términos de COD (o de DQO) respecto a cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

donde:

$D_t$ = porcentaje de eliminación del COD (o de la DQO) al tiempo t,

Cs = concentración de COD (o DQO) en el afluente debida a la sustancia problema, de preferencia estimada a partir de la concentración en la solución madre y del volumen añadido de esta (mg/l),

E = valores de COD (o DQO) medidos en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l),

Eo = valores de COD (o DQO) medidos en el efluente de control al tiempo t (mg/l).

Repítase el cálculo con la eventual sustancia de referencia utilizada.

**Comportamiento del reactor de control**

44. El grado de eliminación del COD (o de la DQO) ($D_B$) del medio orgánico en los reactores de control es un dato útil para evaluar la actividad de biodegradación de la biopelícula durante el ensayo. Calcúlese el porcentaje de eliminación con ayuda de la ecuación siguiente:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\%$$

donde:

Cm = valores de COD (o de DQO) del medio orgánico en el afluente de control (mg/l).

45. Calcúlese la eliminación ($D_{ST}$) de la sustancia problema si se mide con un método analítico específico en cada evaluación programada en el tiempo, con ayuda de la ecuación siguiente:

$$DST = 100\ (1 - Se/Si)\%$$

donde:

Si = concentración medida o, de preferencia, estimada de la sustancia problema en el afluente de ensayo (mg/l),

Se = concentración medida de la sustancia problema en el efluente de ensayo al tiempo t (mg/l).

▼M4

Si el método analítico da un valor positivo en el agua residual no modificada equivalente a $S_e$ mg/l, calcúlese el porcentaje de eliminación ($D_{SC}$) con ayuda de la fórmula siguiente:

$$DSC = 100\ (Si - Se + Sc)/(Si + Sc)\%$$

**Expresión de los resultados del ensayo**

46. Represéntese el porcentaje de eliminación $D_t$ y $D_{ST}$ (o $D_{SC}$), si está disponible, frente al tiempo (véase el apéndice 2 del capítulo C.10 A). Tómese la media (redondeada al número entero más próximo) y la desviación típica de los 12-15 valores de $D_T$ (y de $D_{ST}$, si se dispone de ellos) obtenidos en la fase de meseta como porcentaje de eliminación de la sustancia problema. De la forma de la curva de eliminación pueden deducirse ciertas conclusiones sobre los procesos de eliminación.

**Adsorción**

47. Si al inicio del ensayo se observa una elevada eliminación del COD de la sustancia problema, es probable que esta se elimine por adsorción a la biopelícula. Quizá sea posible comprobar este extremo determinando la sustancia problema adsorbida a los sólidos arrancados de la película. No es normal que la eliminación del COD de sustancias adsorbibles se mantenga elevada durante todo el ensayo; normalmente la eliminación es intensa al principio y después va cayendo gradualmente hasta alcanzar un valor de equilibrio. Si, no obstante, la sustancia problema adsorbida pudiera causar de alguna forma la aclimatación de la población microbiana, la eliminación del COD de la sustancia problema aumentaría posteriormente y alcanzaría un elevado nivel de meseta.

**Tiempo de latencia**

48. Como en los ensayos exploratorios estáticos, muchas sustancias problema requieren una fase de latencia antes de que se produzca la biodegradación plena. En esta fase de latencia, tiene lugar la aclimatación o adaptación de las bacterias competentes, sin que haya apenas eliminación de la sustancia problema; después empieza el crecimiento de estas bacterias. Esta fase termina y se acepta arbitrariamente que comienza la fase de degradación cuando se ha eliminado alrededor del 10 % de la cantidad inicial de sustancia problema (después de tener en cuenta la adsorción, en su caso). La fase de latencia suele ser muy variable y poco reproducible.

**Fase de meseta**

49. La fase de meseta de una curva de eliminación en un ensayo continuo se define como la fase en que se produce el máximo de degradación. Esta fase debe durar al menos 3 semanas y permitir la medición de unos 12-15 valores válidos.

**Grado medio de eliminación de la sustancia problema**

50. Calcúlese la media de los valores de eliminación $D_t$ (y $D_{st}$, cuando se disponga de ellos) de la sustancia problema en la fase de meseta. Redondeado al entero más próximo (1 %), es el grado de eliminación de la sustancia problema. Se recomienda calcular asimismo el intervalo de confianza del 95 % para la media. De forma análoga, calcúlese el grado medio ($D_B$) de eliminación del medio orgánico en el recipiente de control.

▼M4

**Indicación de la biodegradación**

51. Si la sustancia problema no se adsorbe significativamente a la biopelícula y la curva de eliminación tiene la forma típica de una curva de biodegradación con fases de latencia, de degradación y de meseta (puntos 48 y 49), la eliminación medida puede atribuirse con seguridad a la biodegradación. Si ha tenido lugar una eliminación inicial importante, el ensayo de simulación no puede diferenciar entre el proceso de eliminación biológico y el abiótico. En tales casos, y en otros en que haya alguna duda sobre la biodegradación (por ejemplo, si se produce eliminación), se deben analizar en muestras de la película las sustancias problema adsorbidas o efectuar ensayos adicionales estáticos (exploratorios) de la biodegradación, en relación con parámetros que indiquen claramente si se trata de procesos biológicos. Tales ensayos son los métodos de consumo de oxígeno (capítulo C.4-D, E y F del presente anexo) (9) o un ensayo con medición de la producción de $CO_2$ (capítulo C.4-C del presente anexo) o el método del espacio de cabeza (10); debe utilizarse como inóculo biopelícula preexpuesta del reactor adecuado.

52. Si se han medido tanto la eliminación del COD como la eliminación específica de la sustancia, una diferencia significativa (siendo la primera más baja que la segunda) entre los porcentajes de eliminación indica la presencia en los efluentes de productos orgánicos intermedios que pueden ser más difíciles de degradar; habrá que investigar tales productos.

**Validez de los resultados del ensayo**

53. Se considera que el ensayo es válido si el grado de eliminación ($D_B$) del COD (o de la DQO) en las unidades de control es > 80 % tras dos semanas y no se han observado fenómenos inusuales.

54. Si se ha sometido a ensayo una sustancia (de referencia) fácilmente biodegradable, el grado de biodegradación debe ser > 90 % y la diferencia entre los valores de los duplicados no debe superar el 5 %. Si no se cumplen estos dos criterios, revísense los procedimientos experimentales u obténgase agua residual doméstica de otra fuente.

55. Análogamente, las diferencias entre los valores de la biodegradación de unidades duplicadas (en su caso) en que se trate una sustancia problema no deben superar el 5 %. Si no se cumple este criterio pero las eliminaciones son altas, continúese el análisis durante otras tres semanas. Si la eliminación es baja, investíguense los efectos inhibidores de la sustancia problema si no se conocen, y repítase el ensayo con una concentración menor de la sustancia problema, cuando sea posible.

**Informe del ensayo**

56. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Datos de identificación.

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas.

*Condiciones de ensayo:*

— Eventuales modificaciones del sistema de ensayo, especialmente si se han estudiado sustancias insolubles o volátiles.

— Tipo de medio orgánico.

— Proporción y naturaleza de los residuos industriales presentes en las aguas residuales, si se utilizan y conocen.

— Método de inoculación.

▼M4

— Solución madre de sustancia problema: contenido en COD (carbono orgánico disuelto) y COT (carbono orgánico total), forma de preparación si se trata de una suspensión, concentración o concentraciones usadas y justificación si están fuera de la banda de 10 a 20 mg/l de COD, método de adición, fecha de la primera adición, cambios eventuales en la concentración.

— Tiempo medio de retención hidráulica (sin crecimiento), velocidad de giro del tubo, ángulo aproximado de inclinación, si es posible.

— Detalles del arranque, tiempo e intensidad.

— Temperatura del ensayo y banda.

— Técnicas analíticas empleadas.

*Resultados del ensayo:*

— Todos los datos medidos: COD, DQO, análisis específicos, pH, temperatura, sustancias nitrogenadas (cuando sea pertinente).

— Todos los valores calculados de $D_t$ (o $D_{tc}$), $D_B$, $D_S$ obtenidos en formato tabular y las curvas de eliminación.

— Información sobre las fases de latencia y de meseta, duración del ensayo, grado de eliminación de la sustancia problema, de la sustancia de referencia (si se utiliza) y del medio orgánico (en la unidad de control), junto con información estadística y declaraciones sobre la biodegradabilidad y la validez del ensayo.

— Discusión de los resultados.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753-758.

(2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441-444.

(3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214-220.

(4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355-1357.

(5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92-94.

(6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865-881.

(7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.

(8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.

(9) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil" A-F.

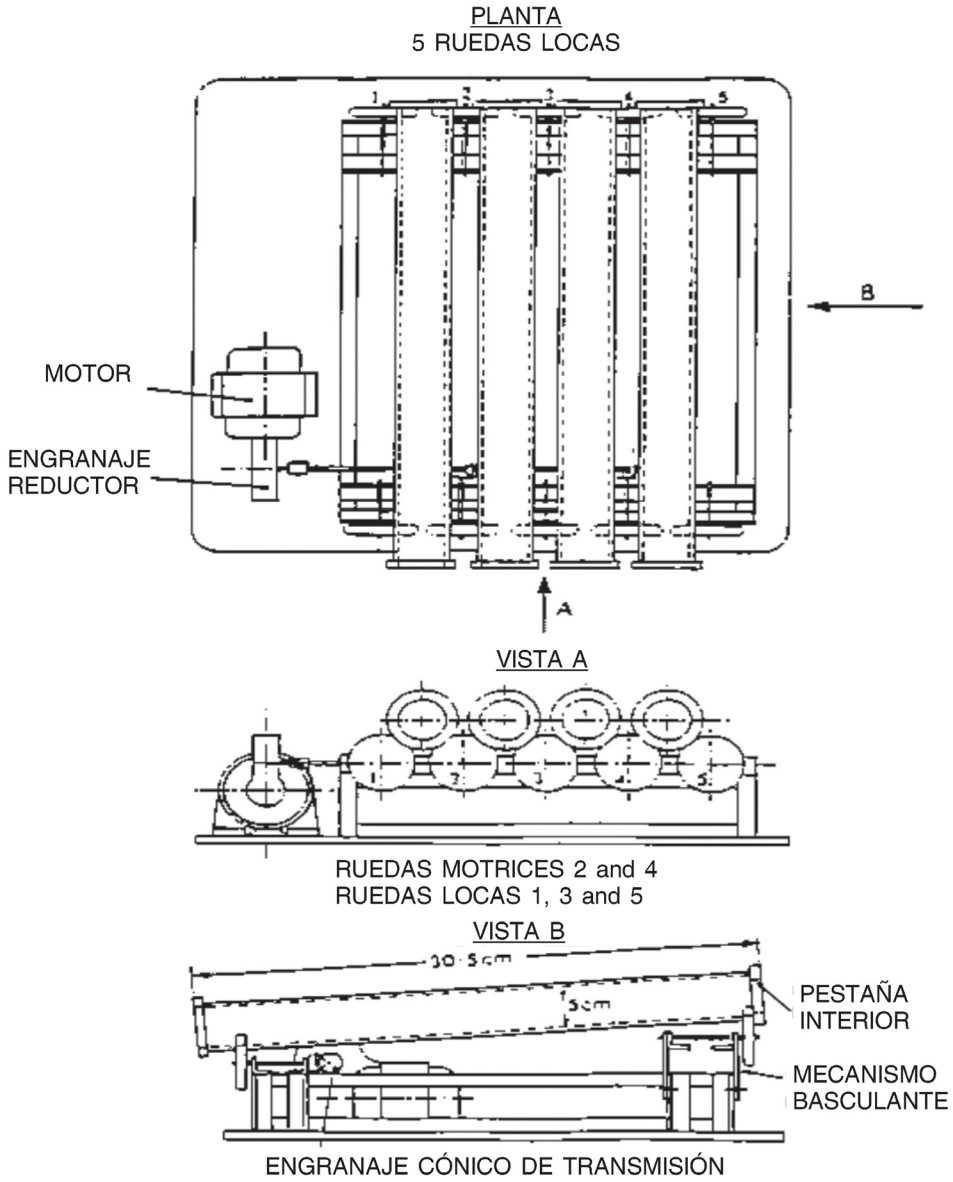
(10) ISO 14593 (1998). Calidad del agua-Evaluación de la biodegradabilidad final de las sustancias orgánicas en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico liberado en recipientes cerrados.

▼**M4**

*Apéndice 8*

*Figura 1*

**Tubos giratorios**




*Glosario:*

Planta

Vista A/B

Ruedas motrices

Ruedas locas

Motor

Engranaje reductor

Pestaña interior

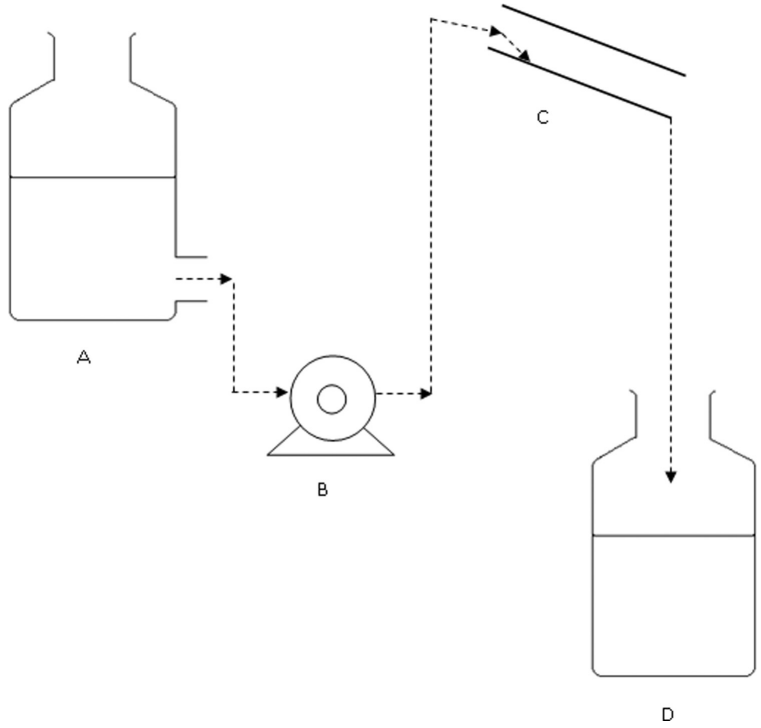
Mecanismo basculante

Engranaje cónico de transmisión

▼**M4**

*Figura 2*

**Diagrama de flujo**




A: Tanque de alimentación

B: Bomba peristáltica

C: Tubo giratorio

D: Recipiente de recogida del efluente

*DEFINICIONES:*

a. Sustancia problema: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

b. Sustancias: Ha de señalarse que en los acuerdos de la CNUMAD y en los documentos subsiguientes se usa el término "producto químico" para referirse a sustancias, productos, mezclas, preparados, o cualesquiera otras denominaciones utilizadas en los sistemas actuales para describir los productos químicos en cuestión. En el presente documento se utiliza el término "sustancia" en este mismo sentido amplio.

▼M6

## C.11. LODO ACTIVADO: PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA RESPIRACIÓN (OXIDACIÓN DE CARBONO Y DE AMONIO)

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 209 (2010). El presente método de ensayo describe un método para determinar los efectos de una sustancia sobre los microorganismos del lodo activado (en gran medida, bacterias) midiendo su tasa de respiración (oxidación de carbono o de amonio) en unas condiciones determinadas y en presencia de concentraciones diferentes de la sustancia problema. El método se basa en el ensayo de la ETAD (asociación ecológica y toxicológica de fabricantes de colorantes) (1) (2), en la versión anterior de las directrices de ensayo de la OCDE TG 209 (3) y en la norma ISO 8192 revisada (4). El objetivo de este ensayo consiste en establecer un método de cribado rápido para evaluar los efectos de las sustancias sobre los microorganismos del lodo activado de la fase biológica (aerobia) de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Los resultados de este ensayo podrán servir también como indicador de las concentraciones no inhibitorias apropiadas de las sustancias problema que hayan de utilizarse en las pruebas de biodegradabilidad (por ejemplo, los capítulos C.4 A-F, C.9, C.10, C.12 y C. 29 del presente anexo, OCDE TG 302C). En este caso, el ensayo puede realizarse como ensayo de cribado, similar a un ensayo de determinación del intervalo o un ensayo límite (véase el punto 39), teniendo en cuenta solamente el conjunto de la respiración. Sin embargo, esta información debe tomarse con precaución en relación con los ensayos de la biodegradabilidad fácil (capítulos C.4 A-F y C.29 del presente anexo) en los que la concentración de inóculo es significativamente inferior a la utilizada en el presente método de ensayo. En efecto, la ausencia de inhibición en esta prueba de respiración no conduce automáticamente a unas condiciones no inhibitorias en el ensayo de biodegradabilidad fácil de los capítulos C.4 A-F o C.29 del presente anexo.

2. En general, parece que el ensayo de inhibición de la respiración se ha aplicado con éxito desde su primera publicación, pero en algunas ocasiones se han notificado resultados engañosos, como, por ejemplo, en las referencias (2), (4) o (5). Las curvas de respiración en función de la concentración son a veces bifásicas, las gráficas dosis-respuesta se distorsionan y los valores de $EC_{50}$ son inesperadamente bajos (5). Las investigaciones han puesto de manifiesto que estos resultados se obtienen cuando el lodo activado utilizado en el ensayo es fuertemente nitrificante y la sustancia problema tiene un impacto mayor en la oxidación del amonio que en la oxidación heterotrófica en general. Por lo tanto, estos resultados engañosos pueden superarse mediante la realización de ensayos adicionales con un inhibidor específico de la nitrificación. Por medición de las tasas de absorción de oxígeno en presencia y en ausencia de un inhibidor de este tipo como, por ejemplo, la N-aliltiourea (ATU), es posible calcular las distintas tasas de absorción de oxígeno total, heterotrófica y de nitrificación (4) (7) (8). Así pues, se pueden calcular los efectos inhibidores de una sustancia problema en los dos procesos y se pueden calcular de la forma habitual los valores de la $EC_{50}$, en relación tanto con la oxidación (heterotrófica) del carbono orgánico como con la oxidación del amonio (nitrificación). Debe señalarse que, en algunos raros casos, el efecto inhibitorio de la N-aliltiourea puede ser parcial o totalmente anulado como consecuencia de la complejación con sustancias problema o suplementos del medio como, por ejemplo, iones $Cu^{++}$ (6). Los iones $Cu^{++}$ son esenciales para *Nitrosomonas*, pero son tóxicos a concentración superior.

3. Se ha hecho urgente, sobre todo en los países europeos, la necesidad de la nitrificación en el tratamiento aeróbico de las aguas residuales, como paso necesario en el proceso de eliminación de los compuestos nitrogenados de las aguas residuales por desnitrificación para formar productos gaseosos; ahora, la UE ha fijado límites más bajos para la concentración de nitrógeno en los efluentes tratados vertidos a las aguas receptoras ([1]).

([1]) Directiva 91/271/CEE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas (DO L 135 de 30.5.1991, p. 40).

▼M6

4. Para la mayoría de los fines, es adecuado utilizar el método para evaluar el efecto solo sobre los procesos de oxidación de carbono orgánico. No obstante, para la interpretación de los resultados y la comprensión de los efectos es necesario en algunos casos un examen del efecto solo sobre la nitrificación o sobre tanto la nitrificación como la oxidación del carbono orgánico por separado.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

5. Las tasas de respiración de las muestras de lodo activado alimentado con agua residual sintética se miden en una celda cerrada que contiene un electrodo de oxígeno después de un tiempo de contacto de 3 horas. Teniendo en cuenta el escenario realista de exposición, podrían ser adecuados unos tiempos de contacto más prolongados. Si la sustancia problema se degrada rápidamente mediante hidrólisis abiótica, por ejemplo, o es volátil y la concentración no puede mantenerse adecuadamente, puede utilizarse además un período de exposición más corto, por ejemplo de 30 minutos. La sensibilidad de cada lote de lodo activado debe comprobarse el día de la exposición con una sustancia de referencia apropiada. El ensayo se utiliza típicamente para determinar la $EC_x$ (p. ej., la $EC_{50}$) de la sustancia problema o la concentración sin efecto observado (NOEC).

6. La inhibición de la absorción de oxígeno por microorganismos que oxidan el carbono orgánico puede expresarse aparte de la correspondiente a los microorganismos que oxidan el amonio, a través de mediciones de las tasas de absorción de oxígeno en ausencia y en presencia de N-aliltiourea, que es un inhibidor específico de la oxidación del amonio a nitrito por las bacterias nitrificantes de la primera fase. En este caso, el porcentaje de inhibición de la tasa de absorción de oxígeno se calcula mediante comparación de la tasa de absorción de oxígeno en presencia de la sustancia problema con la tasa media de absorción de oxígeno de los correspondientes controles sin sustancia problema, en ambas ocasiones tanto en presencia como en ausencia del inhibidor específico, la N-aliltiourea.

7. La eventual absorción de oxígeno debida a procesos abióticos puede detectarse mediante la determinación de la tasa en mezclas de sustancia problema, medio de agua residual sintética y agua, prescindiendo del lodo activado.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

8. Para poder interpretar correctamente los resultados, es necesario conocer la identidad (de preferencia, el número CAS), el nombre (IUPAC) y las características de pureza, hidrosolubilidad, presión de vapor, volatilidad y adsorción de la sustancia problema. Normalmente no es posible hacer el ensayo de manera adecuada con sustancias volátiles, salvo que se adopten precauciones especiales (véase el punto 21).

APLICABILIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO

9. El método de ensayo puede aplicarse a sustancias hidrosolubles, poco solubles y volátiles. Sin embargo, puede que no siempre sea posible obtener valores de $EC_{50}$ con sustancias de solubilidad limitada, y solo pueden obtenerse resultados válidos con sustancias volátiles si la mayor parte (por ejemplo, > 80 %) de la sustancia problema permanece en la mezcla de reacción al final del período o períodos de exposición. Deben presentarse datos analíticos adicionales de apoyo para afinar la concentración $EC_x$ cuando exista incertidumbre acerca de la estabilidad de la sustancia problema o de su volatilidad.

▼M6

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

10. Deben someterse al ensayo periódicamente sustancias de referencia, con el fin de garantizar que son fiables el método de ensayo y las condiciones de ensayo, y para comprobar la sensibilidad de cada lote de lodo activado utilizado como inóculo microbiano el día de la exposición. Se recomienda como sustancia inhibidora de referencia el 3,5-diclorofenol (3,5-DCP) puesto que es un conocido inhibidor de la respiración y se utiliza en numerosos tipos de ensayo de inhibición/toxicidad (4). Asimismo, puede utilizarse el sulfato de cobre (II) pentahidratado como sustancia de referencia para la inhibición de la respiración total (9). La N-metilanilina puede utilizarse como inhibidor específico de referencia de la nitrificación (4).

CRITERIOS DE VALIDEZ Y REPRODUCIBILIDAD

11. La tasa de consumo de oxígeno de los controles en blanco (sin la sustancia problema ni la sustancia de referencia) no debe ser inferior a 20 mg de oxígeno por gramo de lodo activado (peso seco de los sólidos en suspensión) en una hora. Si la tasa es inferior, debe repetirse el ensayo con lodo activado lavado o con lodo de otra fuente. El coeficiente de variación de la tasa de absorción de oxígeno en las réplicas de los controles no debe ser superior al 30 % al final del ensayo definitivo.

12. En un ensayo interlaboratorios internacional de 2004, organizado por la ISO (4) con fangos activados procedentes de aguas residuales domésticas, se observó que la $EC_{50}$ del 3,5-DCP se halla en el intervalo de 2 mg/l a 25 mg/l para la respiración total, de 5 mg/l a 40 mg/l para la respiración heterotrófica y de 0,1 mg/l a 10 mg/l para la respiración de nitrificación. Si la $EC_{50}$ del 3,5-DCP no está en el intervalo esperado, hay que repetir el ensayo con lodo activado procedente de otra fuente. La $EC_{50}$ del sulfato de cobre (II) pentahidratado debe situarse en el intervalo de 53- 155 mg/l para la respiración total (9).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

**Recipientes y equipo del ensayo**

13. Se utilizará material habitual de laboratorio, además de lo siguiente:

a) recipientes de ensayo como, por ejemplo, vasos de 1 000 ml que contengan 500 ml de la mezcla de reacción (véase 5 en la figura 1);

b) celda y accesorios para medir la concentración de oxígeno disuelto, un electrodo de oxígeno adecuado, una celda cerrada para contener la muestra sin espacio libre y un registrador (por ejemplo, 7, 8, 9 en la figura 1 del apéndice 2); otra posibilidad es utilizar un frasco de DBO con un adaptador de manguito adecuado para sellar el electrodo de oxígeno con el cuello del frasco (véase la figura 2 del apéndice 3); a fin de evitar la pérdida de líquido desplazado cuando se inserte el electrodo de oxígeno, es aconsejable introducir primero un embudo o tubo de vidrio a través del manguito, o utilizar recipientes de bordes ensanchados; en ambos casos debe utilizarse un agitador magnético u otro método de agitación como, por ejemplo, una sonda de agitación propia;

c) agitadores magnéticos con sus barritas, revestidas de material inerte, para su uso en la cámara de medición o en los recipientes de ensayo;

d) dispositivo de aireación: en caso necesario, debe pasarse aire comprimido a través de un filtro adecuado, para eliminar el polvo y el aceite, y a través de frascos de lavado con agua para humidificarlo; el contenido de los recipientes debe airearse con pipetas Pasteur, u otros dispositivos de

▼M6

aireación que no adsorban las sustancias; puede utilizarse un agitador orbital a una velocidad de entre 150 y 250 rpm con frascos de, por ejemplo, 2 000 ml de capacidad, para satisfacer la demanda de oxígeno del lodo y superar las dificultades planteadas por las sustancias que producen espuma excesiva, que son volátiles y, por lo tanto, se pierden, o que son difíciles de dispersar cuando se airean por corriente de aire; el sistema de ensayo es, por lo general, una serie de vasos aireados permanentemente, establecidos de forma secuencial (por ejemplo, a intervalos de unos 10 o 15 minutos), y analizados después de manera secuencial; también puede utilizarse instrumentación validada que permita simultáneamente la aireación y la medición de la tasa de absorción de oxígeno en las mezclas;

e) pH-metro;

f) centrifugadora general de sobremesa para lodo, capaz de funcionar a 10 000 $m/s^2$.

**Reactivos**

14. Deben utilizarse siempre reactivos de grado analítico.

**Agua**

15. Debe utilizarse agua destilada o desionizada, con menos de 1 mg/l de COD, salvo en caso de que se especifique agua del grifo exenta de cloro.

**Agua residual sintética**

16. El medio debe prepararse de forma que contenga los siguientes componentes en las cantidades indicadas:

| | |
|---|---|
| — peptona | 16 g |
| — extracto de carne (o extracto vegetal comparable) | 11 g |
| — urea | 3 g |
| — cloruro de sodio (NaCl) | 0,7 g |
| — cloruro de calcio dihidratado ($CaC1_2 \cdot 2H_2O$) | 0,4 g |
| — sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) | 0,2 g |
| — monohidrogenofosfato de potasio anhidro ($K_2HPO_4$) | 2,8 g |
| — agua destilada o desionizada hasta enrasar a 1 litro. | |

17. El pH de esta solución debe ser 7,5 ± 0,5. Si el medio así preparado no va a utilizarse inmediatamente, debe conservarse en la oscuridad y a una temperatura de 0 a 4 °C, durante una semana como máximo, o en condiciones que no cambien su composición. Ha de tenerse en cuenta que esta agua residual sintética está 100 veces más concentrada que la descrita en el Informe Técnico de la OCDE, «Método propuesto para la determinación de la biodegradabilidad de los tensioactivos utilizados en los detergentes sintéticos» de 11 de junio de 1976; además se le ha añadido hidrogenofosfato dipotásico.

▼M6

18. Otra posibilidad es esterilizar los distintos componentes por separado, antes de su almacenamiento, o añadir la peptona y el extracto de carne poco antes de efectuar el ensayo. Antes de su utilización, el medio debe homogeneizarse bien y el pH ajustarse en caso necesario a un valor de 7,5 ± 0,5.

**Sustancia problema**

19. En el caso de las sustancias problema fácilmente hidrosolubles, debe prepararse una solución madre solo hasta el límite de solubilidad (no es aceptable la presencia de precipitado). Las sustancias poco hidrosolubles, las mezclas con componentes de diferentes hidrosolubilidades y las sustancias adsorbentes deben pesarse directamente en los recipientes de ensayo. En estos casos, el uso de soluciones madre puede ser una alternativa si se determinan analíticamente en los recipientes de ensayo las concentraciones disueltas de las sustancias problema (antes de la adición de lodo activado). Si se preparan fracciones acomodadas en agua (WAF), es también esencial una determinación analítica de la concentración disuelta de las sustancias problema en los recipientes de ensayo. Debe evitarse recurrir a disolventes orgánicos, emulgentes o dispersantes para mejorar la solubilidad. Es posible aplicar ultrasonidos a las soluciones madre y someter las suspensiones a una agitación previa, por ejemplo durante la noche, cuando se disponga de información adecuada sobre la estabilidad de la sustancia problema en tales condiciones.

20. La sustancia problema puede afectar negativamente al pH del sistema de ensayo. El pH de las mezclas tratadas con la sustancia problema debe determinarse antes de la prueba, en un ensayo preliminar, para determinar si es necesario un ajuste del pH antes de la prueba principal, y de nuevo el día de la prueba principal. Las soluciones o suspensiones de la sustancia problema en el agua deben neutralizarse antes de la adición del inóculo, si fuera necesario. No obstante, dado que la neutralización puede modificar las propiedades químicas de la sustancia, pueden efectuarse otros ensayos, en función de los objetivos del estudio, para evaluar el efecto de la sustancia problema sobre el lodo sin ajuste del pH.

21. Los efectos tóxicos de las sustancias volátiles, especialmente en ensayos en los que se burbujea aire a través del sistema, pueden dar lugar a niveles de efectos variables debido a pérdidas de la sustancia durante el período de exposición. Hay que tener cuidado con tales sustancias realizando análisis específicos de ellas en mezclas de control que las contengan y modificando el régimen de aireación.

**Sustancia de referencia**

22. Si se utiliza como sustancia de referencia el 3,5-diclorofenol, debe prepararse una solución de 1,00 g de 3,5-diclorofenol en 1 000 ml de agua (15). Para acelerar la disolución se debe utilizar agua caliente o aplicar ultrasonidos; se lleva al volumen final una vez se haya enfriado a temperatura ambiente. Sin embargo, debe garantizarse que la sustancia de referencia no se modifica estructuralmente. El pH de la solución debe comprobarse y, en caso necesario, ajustarse con NaOH o $H_2SO_4$ a un pH de 7 — 8.

23. Si se utiliza como sustancia de referencia el sulfato de cobre (II) pentahidratado, se emplean las concentraciones de 58 mg/l, 100 mg/l y 180 mg/l (factor de 1,8). La sustancia se pesa directamente en los recipientes de ensayo (29 - 50 - 90 mg para 500 ml de volumen total). A continuación se disuelve con 234 ml de agua del grifo tratada en autoclave. El sulfato de cobre (II) pentahidratado es fácilmente soluble. Cuando se inicia el ensayo, se añaden 16 ml de agua residual sintética y 250 ml de lodo activado.

▼M6

**Inhibidor específico de la nitrificación**

24. Debe prepararse una solución madre de 2,32 g/l de N-aliltiourea (ATU). La adición de 2,5 ml de esta solución madre a una mezcla de incubación de 500 ml de volumen final da lugar a una concentración final de 11,6 mg de ATU/l ($10^{-4}$ mol/l), de la que se sabe (4) que es suficiente para causar una inhibición del 100 % de la nitrificación en un lodo activado nitrificante que contenga 1,5 g/l de sólidos suspendidos.

**Control abiótico**

25. En algunas circunstancias poco frecuentes, una sustancia problema con fuertes propiedades reductoras puede provocar un consumo abiótico mensurable de oxígeno. En tales casos, es necesario contar con controles abióticos para discriminar entre absorción abiótica de oxígeno por la sustancia problema y respiración microbiana. Los controles abióticos pueden prepararse omitiendo el inóculo de las mezclas de ensayo. Del mismo modo, pueden incluirse controles abióticos sin inóculo cuando se llevan a cabo mediciones analíticas de apoyo para determinar la concentración obtenida durante la fase de exposición del ensayo, por ejemplo en caso de utilización de soluciones madre de sustancias poco hidrosolubles con componentes con diferente hidrosolubilidad. En casos concretos, puede ser necesario preparar un control abiótico con inóculo esterilizado (por ejemplo, mediante tratamiento en autoclave o añadiendo sustancias tóxicas esterilizadoras). Algunas sustancias pueden producir o consumir oxígeno solo si la superficie es lo suficientemente grande para reaccionar, incluso aunque en general necesiten una presión o temperatura mucho más elevada para hacerlo. A este respecto debe prestarse especial atención a los peróxidos. Un inóculo esterilizado ofrece una gran superficie.

**Inóculo**

26. Para el uso general, debe recogerse lodo activado a la salida del tanque de aireación, o cerca de la salida del tanque, de una planta de tratamiento de aguas residuales con funcionamiento adecuado alimentada predominantemente con aguas residuales domésticas. En función del objetivo del ensayo, pueden ser adecuados también otros tipos de lodo activado como, por ejemplo, lodo cultivado en el laboratorio, con unas concentraciones adecuadas de sólidos en suspensión (de 2 a 4 g/l). Sin embargo, es probable que los lodos procedentes de distintas plantas de tratamiento presenten distintas características y sensibilidades.

27. El lodo puede utilizarse tal como se recoge, pero deben retirarse las partículas gruesas dejando sedimentar un poco tiempo, por ejemplo de 5 a 15 minutos, y decantando la capa superior de sólidos más finos, o tamizando (p. ej., con una luz de malla de 1 $mm^2$). Otra alternativa es homogeneizar el lodo en un mezclador durante al menos 15 segundos, pero hay que prestar atención a las fuerzas de cizalla y al cambio de temperatura que pueden producirse si dura mucho la operación de mezclado.

28. A menudo es necesario lavar el lodo como, por ejemplo, cuando es baja la tasa de respiración endógena. En primer lugar, el lodo debe centrifugarse durante un tiempo para producir un sobrenadante claro y un precipitado de sólidos de agua residual, por ejemplo 10 minutos a aproximadamente 10 000 $m/s^2$. El líquido sobrenadante debe desecharse y el lodo se vuelve a suspender en agua del grifo sin cloro, con agitación, y esta agua de lavado se elimina después volviendo a centrifugar y desechándola de nuevo. El proceso de lavado y centrifugado debe repetirse en caso necesario. Debe determinarse la masa seca de un volumen conocido de lodo resuspendido, y el lodo se concentra

▼M6

eliminando líquido o bien se diluye más en agua del grifo sin cloro, según sea necesario para obtener la concentración requerida de sólidos en el lodo, de 3 g/l. El lodo activado debe airearse continuamente (p. ej., 2 l/min) a la temperatura del ensayo y, cuando sea posible, utilizarse el mismo día de su recogida. Si esto no es posible, el lodo debe alimentarse diariamente con el agua residual sintética (50 ml de agua residual sintética por litro de lodo activado) durante dos días adicionales. El lodo se utiliza a continuación para el ensayo y los resultados se aceptan como válidos, a condición de que no se produzca ningún cambio significativo en su actividad, evaluada por su tasa de respiración endógena heterotrófica y de nitrificación.

29. Pueden surgir dificultades si se forma espuma durante la incubación hasta el punto de que la espuma y los sólidos del lodo en ella transportados salen de los recipientes de aireación. En ocasiones, la formación de espuma puede resultar simplemente de la presencia de agua residual sintética, pero debe contarse con esta formación de espuma si la sustancia problema es, o contiene, un tensioactivo. La pérdida de sólidos del lodo de las mezclas de ensayo tendrá como resultado unas tasas de respiración reducidas artificialmente, que podrían interpretarse indebidamente como debidas a la inhibición. Además, la aireación de la solución del tensioactivo concentra a este en la capa de espuma; la pérdida de espuma del sistema de ensayo conducirá a una disminución de las concentraciones de exposición. La formación de espuma puede controlarse mediante métodos mecánicos simples (por ejemplo, agitación manual esporádica con una varilla de vidrio) o mediante la adición de un agente antiespumante en emulsión de silicona exenta de tensioactivos, y/o utilizando el método de aireación en frascos de agitación. Si el problema está asociado con la presencia del agua residual sintética, la composición de esta puede modificarse con la inclusión de un agente antiespumante en la proporción de, p. ej., 50 µl/l. Si la espuma se debe a la sustancia problema, hay que determinar la cantidad necesaria para su supresión a la concentración máxima de ensayo, y a continuación hay que tratar todos los distintos recipientes de aireación de la misma manera (incluidos también los controles en blanco y los recipientes de referencia en los que no hay espuma). Si se emplean agentes antiespumantes, no debería producirse ninguna interacción con el inóculo ni con la sustancia problema.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

30. Puede determinarse la inhibición de tres absorciones de oxígeno diferentes: la total, la solo heterotrófica y la debida a la nitrificación. Normalmente debe ser adecuada la medición de la inhibición de la absorción total de oxígeno. Es necesario determinar los efectos sobre la absorción heterotrófica de oxígeno debida a la oxidación del carbono orgánico, y sobre la debida a la oxidación del amonio cuando exista un requisito específico de estos dos parámetros por separado en relación con una sustancia particular, o (de forma optativa) para explicar las eventuales curvas dosis-respuesta atípicas obtenidas en el estudio de la inhibición de la absorción total de oxígeno.

**Condiciones de ensayo**

31. El ensayo debe realizarse a la temperatura de 20 ± 2 °C.

**Mezclas de ensayo**

32. Deben prepararse mezclas de ensayo (indicadas como $F_T$ en el cuadro 1) con agua, agua residual sintética y la sustancia problema para obtener diferentes concentraciones nominales de la sustancia problema (véanse en el cuadro 1 ejemplos de volúmenes de los componentes). Hay que ajustar el pH a 7,5 ± 0,5, si es necesario; las mezclas deben diluirse con agua y se añade el inóculo para obtener el mismo volumen final en los recipientes y comenzar la aireación.

**Mezclas de referencia**

33. Deben prepararse mezclas ($F_R$) con la sustancia de referencia, por ejemplo, 3,5-diclorofenol, en lugar de la sustancia problema, de la misma manera que las mezclas de ensayo.

▼M6

**Controles en blanco**

34. Deben prepararse controles en blanco ($F_B$) al comienzo y al final del período de exposición en ensayos en los que se establecen los vasos del ensayo secuencialmente a intervalos. En los ensayos efectuados con equipo que permita la medición simultánea del consumo de oxígeno, se deben incluir al menos dos controles en blanco en cada lote de análisis simultáneo. Los controles en blanco contienen volúmenes iguales de lodo activado y de medio sintético, pero no tienen sustancia problema ni sustancia de referencia. Deben diluirse con agua hasta el mismo volumen que las mezclas de ensayo y de referencia.

**Control abiótico**

35. En caso necesario, por ejemplo si se sabe o sospecha que la sustancia problema presenta propiedades reductoras fuertes, debe prepararse una mezcla $F_A$ para medir el consumo abiótico de oxígeno. La mezcla debe tener las mismas cantidades de sustancia problema y de agua residual sintética, y el mismo volumen que las mezclas de ensayo, pero sin lodo activado.

**Procedimiento general y mediciones**

36. Las mezclas de ensayo, las mezclas de referencia y los controles en blanco y abióticos se incuban a la temperatura de ensayo en condiciones de aireación forzada (de 0,5 a 1 l/min) para mantener la concentración de oxígeno disuelto por encima del 60 — 70 % de la saturación y mantener en suspensión los flóculos de lodo. También es necesario agitar los cultivos para mantener en suspensión los flóculos de lodo. Se considera que la incubación empieza con el contacto inicial del inóculo de lodo activado con los demás componentes de la mezcla final. Al final de la incubación, después de los períodos de exposición especificados, que suelen ser de 3 horas, se toman muestras para medir la tasa de disminución de la concentración de oxígeno disuelto en la celda diseñada a tal fin (figura 2 del apéndice 3) o en un frasco de DBO completamente lleno. La manera de empezar la incubación también depende de la capacidad del equipo empleado para medir las tasas de consumo del oxígeno. Por ejemplo, en el caso de que comprenda una única sonda de oxígeno, las mediciones se efectuarán de forma individual. En este caso, deben prepararse las diversas mezclas necesarias para el ensayo con agua residual sintética pero sin el inóculo, y a cada recipiente de la serie se le añaden las cantidades necesarias de lodo. Las incubaciones deben iniciarse por turnos, a intervalos establecidos de forma conveniente, por ejemplo de 10 a 15 minutos. Otra posibilidad es que el sistema de medición cuente con varias sondas que faciliten la realización de múltiples mediciones simultáneas; en este caso, el inóculo puede añadirse al mismo tiempo a los grupos pertinentes de recipientes.

37. La concentración de lodo activado en todas las mezclas de ensayo, de referencia y en blanco (pero no en el control abiótico) es nominalmente de 1,5 g/l de sólidos en suspensión. El consumo de oxígeno debe medirse tras 3 horas de exposición. Deben efectuarse mediciones también tras una exposición de 30 minutos, cuando proceda y según se describe en el punto 5.

**Potencial de nitrificación del lodo**

38. Con el fin de decidir si el lodo es nitrificante y, en caso afirmativo, a qué tasa, deben prepararse mezclas ($F_B$) como la del control en blanco y otras mezclas de «control» ($F_N$) que también contengan N-aliltiourea a la concentración de 11,6 mg/l. Las mezclas deben airearse e incubarse a 20° ± 2 °C

▼M6

durante 3 horas. A continuación, deben medirse las tasas de absorción de oxígeno y calcularse la tasa de absorción de oxígeno debida a la nitrificación.

**Diseños del ensayo**

*Ensayo de determinación del intervalo*

39. Se utiliza un ensayo preliminar, cuando sea necesario, para hacer una estimación del intervalo de concentraciones de la sustancia problema necesario en un ensayo definitivo para determinar la inhibición del consumo de oxígeno. De manera alternativa, la inexistencia de inhibición del consumo de oxígeno por la sustancia problema en un ensayo preliminar puede demostrar que es innecesario un ensayo definitivo, pero debe estudiarse por triplicado la concentración de ensayo más elevada del ensayo preliminar (normalmente de 1 000 mg/l, aunque esto depende de los requisitos de datos).

*Cuadro 1.*

**Ejemplos de mezclas del ensayo preliminar.**

| Reactivo | Concentración original | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Solución madre de sustancia problema | 10 g/l | | | | |
| Solución madre de medio sintético | Véase el punto 16. | | | | |
| Suspensión madre de lodo activado | 3 g/l of suspended solids | | | | |
| Componentes de las mezclas | Dosificación en los recipientes de ensayo [a] | | | | |
| | $F_{T1}$ | $F_{T2}$ | $F_{T3-5}$ | $F_{B1-2}$ | $F_A$ |
| Solución madre de sustancia problema (ml) (puntos 19 a 21) | 0,5 | 5 | 50 | 0 | 50 |
| Solución madre de agua residual sintética (ml) (punto 16). | 16 | 16 | 16 | 16 | 16 |
| Suspensión de lodo activado (ml) (puntos 26 a 29) | 250 | 250 | 250 | 250 | 0 |
| Agua (punto 15) | 233,5 | 229 | 184 | 234 | 434 |
| Volumen total de las mezclas (ml) | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 |
| Concentrations in the mixture | | | | | |
| Suspensión de ensayo (mg/l) Lodo activado | 10 | 100 | 1 000 | 0 | 1 000 |
| (sólidos en suspensión) (mg/l) | 1 500 | 1 500 | 1 500 | 1 500 | 0 |

[a] Debe seguirse el mismo procedimiento con la sustancia de referencia para obtener frasco $F_{R1-3}$

40. El ensayo se debe realizar utilizando un mínimo de tres concentraciones de la sustancia problema, por ejemplo de 10 mg/l, 100 mg/l y 1 000 mg/l, con un control en blanco y, en caso necesario, un mínimo de tres controles abióticos con las concentraciones más elevadas de la sustancia problema

▼M6

(véase, a título de ejemplo, el cuadro 1). Lo ideal es que la concentración más baja no tenga ningún efecto en el consumo de oxígeno. Deben calcularse las tasas de absorción de oxígeno y la tasa de nitrificación, en su caso; después debe calcularse el porcentaje de inhibición. Según el objetivo del ensayo, también es posible determinar simplemente la toxicidad de una concentración límite como, p. ej., 1 000 mg/l. Si a esta concentración no se dan efectos tóxicos estadísticamente significativos, no es necesario efectuar más ensayos a concentraciones más altas ni más bajas. Ha de señalarse que las sustancias poco hidrosolubles, las mezclas con componentes de diferentes hidrosolubilidades y las sustancias adsorbentes deben pesarse directamente en los recipientes de ensayo. En este caso, el volumen reservado para la solución madre de sustancia problema debe sustituirse con agua de dilución.

*Ensayo definitivo*

Inhibición de la absorción de oxígeno total

41. El ensayo debe realizarse con un intervalo de concentraciones deducido del ensayo preliminar. A fin de obtener tanto una NOEC como una $EC_x$ (p. ej., $EC_{50}$), se recomienda utilizar en la mayoría de los casos seis controles y cinco concentraciones de tratamiento en progresión geométrica, con cinco réplicas. El control abiótico no tiene que repetirse si no hay absorción de oxígeno en el ensayo preliminar, pero si se produce una absorción significativa deben incluirse controles abióticos con cada concentración de sustancia problema. La sensibilidad del lodo debe comprobarse utilizando la sustancia de referencia 3,5-diclorofenol. La sensibilidad del lodo debe comprobarse con cada serie de ensayos, ya que se sabe que la sensibilidad fluctúa. En todos los casos, se retiran muestras de los recipientes de ensayo después de 3 horas, y también después de 30 minutos en caso necesario, para medir la tasa de absorción de oxígeno en la celda del electrodo de oxígeno. A partir de los datos obtenidos, se calculan las tasas de respiración específicas del control y de las mezclas de ensayo; el porcentaje de inhibición se calcula a partir de la ecuación 7 que figura más abajo.

Diferenciación entre inhibición de la respiración heterotrófica y de la nitrificación

42. La utilización del inhibidor específico de la nitrificación, la ATU, permite la evaluación directa de los efectos inhibidores de la sustancia problema sobre la oxidación heterotrófica y, restando la tasa de absorción de oxígeno en presencia de ATU de la tasa de absorción total (sin presencia de ATU), pueden calcularse los efectos sobre la tasa de nitrificación. Deben prepararse dos conjuntos de mezclas de reacción de acuerdo con los diseños del ensayo respecto a la $CE_x$ o la NOEC descritos en el punto 41, pero, además, debe añadirse ATU a cada mezcla de uno de los conjuntos a una concentración final de 11,6 mg/l, que se ha demostrado que inhibe completamente la nitrificación en lodos con unas concentraciones de sólidos en suspensión de hasta 3 000 mg/l (4). Las tasas de absorción de oxígeno deben medirse tras el período de exposición; estos valores directos representan solo la respiración heterotrófica, y las diferencias entre estos y las tasas de respiración total correspondientes representan la nitrificación. A partir de estos datos se calculan los diversos grados de inhibición.

**Mediciones**

43. Tras el período o períodos de exposición, debe transferirse una muestra del primer recipiente de aireación a la celda del electrodo de oxígeno (figura 1 del apéndice 2) y debe medirse inmediatamente la concentración de oxígeno disuelto. Si se dispone de un sistema de electrodos múltiples, las mediciones podrán efectuarse simultáneamente. Es esencial agitar (mediante un imán recubierto) a la misma velocidad que cuando se calibra el electrodo para garantizar que la sonda responde con un retraso mínimo a la evolución de las concentraciones de oxígeno, y para permitir mediciones regulares y reproducibles del oxígeno en el recipiente de medición. Por lo general, es adecuado el sistema de sonda de agitación propia que tienen algunos electrodos de oxígeno. La celda debe lavarse con agua entre medición y medición. Como alternativa, puede utilizarse la muestra para llenar un frasco de

▼M6

DBO (figura 2 del apéndice 3) provisto de un agitador magnético. A continuación debe insertarse en el cuello del frasco una sonda de oxígeno con un adaptador de manguito y debe ponerse en funcionamiento el agitador magnético. En ambos casos, la concentración de oxígeno disuelto debe medirse de forma continua y registrarse durante un tiempo, generalmente de 5 a 10 minutos, o hasta que la concentración de oxígeno descienda por debajo de 2 mg/l. Se debe extraer el electrodo, devolver la mezcla al recipiente de aireación y continuar la aireación y agitación, si resulta necesario efectuar mediciones tras un tiempo de exposición más prolongado.

**Verificación de la concentración de la sustancia problema**

44. En algunos casos puede ser necesario medir la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo. Hay que señalar que, si se utilizan soluciones madre de:

— sustancias poco hidrosolubles,

— mezclas con componentes con diferentes hidrosolubilidades, o

— sustancias con buena hidrosolubilidad pero cuya concentración en la solución madre está cercana al máximo de hidrosolubilidad,

entonces no se conoce la fracción disuelta, y tampoco se conoce la concentración real de la sustancia problema que se transfiere a los recipientes de ensayo. Con el fin de caracterizar la exposición, es necesaria una estimación analítica de las concentraciones de la sustancia problema en los recipientes de ensayo. Por razones de simplificación, la estimación analítica debe efectuarse antes de la adición del inóculo. Debido a que a los recipientes de ensayo solamente se transfieren fracciones disueltas, las concentraciones medidas pueden ser muy bajas.

45. Para evitar lentos y costosos análisis, se recomienda pesar simplemente la sustancia problema directamente en los recipientes de ensayo y referirse a la concentración nominal inicial pesada para los cálculos posteriores. No es necesario diferenciar entre fracciones disueltas, no disueltas o adsorbidas de la sustancia problema, ya que todas estas fracciones aparecen igualmente en condiciones reales en una planta de tratamiento de aguas residuales, y estas fracciones pueden variar en función de la composición de las aguas residuales. La finalidad del método de ensayo es estimar de forma realista una concentración no inhibidora, y no es adecuado investigar con más detalle qué fracciones aportan su contribución a la inhibición de los microorganismos del lodo activado. Por último, conviene pesar directamente en los recipientes de ensayo también las sustancias adsorbentes, y los recipientes deben silanizarse para reducir al mínimo las pérdidas por adsorción.

DATOS E INFORME

**Cálculo de las tasas de absorción de oxígeno**

46. Las tasas de absorción de oxígeno se deben calcular a partir de la media de los valores medidos, por ejemplo de la parte lineal de las gráficas de la concentración de oxígeno frente al tiempo, limitándose los cálculos a las concentraciones de oxígeno entre 2,0 mg/l y 7,0 mg/l, ya que unas concentraciones superiores e inferiores pueden influir en la tasa de consumo. A veces es inevitable y necesario llegar a bandas de concentración por debajo o por encima de estos valores, por ejemplo cuando la respiración se suprime intensamente y, por lo tanto, es muy lenta, o si un lodo activado particular

▼**M6**

respira con gran rapidez. Esto es aceptable a condición de que las secciones ampliadas de la curva de absorción sean rectas y sus gradientes no cambien al pasar por los límites de 2,0 mg/l o 7,0 mg/l de $O_2$. Las eventuales secciones en curva de la gráfica indican que el sistema de medición se está estabilizando o que la tasa de absorción está cambiando, y no deben utilizarse para el cálculo de las tasas de respiración. La tasa de absorción de oxígeno se debe expresar en miligramos por litro por hora (mg/lh) o miligramos por gramo de lodo seco por hora (mg/gh). La tasa de consumo de oxígeno, R, en mg/lh, puede ser calculada o interpolada a partir de la parte lineal de la curva registrada de disminución del oxígeno de acuerdo con la ecuación 1:

$$R = (Q_1 - Q_2)/\Delta_t \times 60 \qquad (1)$$

donde:

$Q_1$ es la concentración de oxígeno al inicio de la sección seleccionada de la fase lineal (mg/l);

$Q_2$ es la concentración de oxígeno al final de la sección seleccionada de la fase lineal (mg/l);

$\Delta_t$ es el intervalo de tiempo entre estas dos mediciones (min).

47. La tasa de respiración específica ($R_S$) se expresa como la cantidad de oxígeno consumido por gramo de peso seco de lodo en una hora (mg/gh) de acuerdo con la ecuación 2:

$$R_s = R/SS \qquad (2)$$

donde SS es la concentración de sólidos en suspensión en la mezcla de ensayo (g/l).

48. Los diferentes subíndices de R, que pueden combinarse, son:

S tasa específica

T tasa de respiración total

N tasa debida a la respiración de nitrificación

H tasa debida a la respiración heterotrófica

A tasa debida a procesos abióticos

B tasa de los ensayos en blanco (media).

**Cálculo de la tasa de absorción de oxígeno debida a la nitrificación**

49. La relación entre la respiración total ($R_T$), la respiración de nitrificación ($R_N$) y la respiración heterotrófica ($R_H$) viene dada por la ecuación 3:

$$R_N = R_T - R_H \qquad (3)$$

donde:

$R_N$ es la tasa de absorción de oxígeno debida a la nitrificación (mg/lh);

$R_T$ es la tasa medida de absorción de oxígeno por el control en blanco (sin ATU; $F_B$) (mg/lh);

$R_H$ es la tasa medida de absorción de oxígeno por el control en blanco al que se ha añadido ATU ($F_N$) (mg/lh).

▼M6

50. Esta relación es válida para los valores del blanco ($R_{NB}$, $R_{TB}$, $R_{HB}$), de los controles abióticos ($R_{NA}$, $R_{TA}$, $R_{HA}$) y de los ensayos con sustancias problema ($R_{NS}$, $R_{TS}$, $R_{HS}$) (mg/gh). Las tasas de respiración específicas se calculan de la forma siguiente:

$$R_{NS} = R_N/SS \quad (4)$$

$$R_{TS} = R_T/SS \quad (5)$$

$$R_{HS} = R_H/SS \quad (6)$$

51. Si $R_N$ es insignificante (por ejemplo, < 5 % de $R_T$ en los controles en blanco) en un ensayo preliminar, puede considerarse que la absorción heterotrófica de oxígeno es igual a la absorción total y que no se está produciendo nitrificación. Sería necesario recurrir a una fuente alternativa de lodo activado en caso de que los ensayos hubieran de considerar los efectos sobre microorganismos heterotróficos y nitrificantes. Se realiza un ensayo definitivo si hay pruebas de que se reducen las tasas de absorción de oxígeno con diferentes concentraciones de sustancia problema.

**Cálculo del porcentaje de inhibición**

52. El porcentaje de inhibición del consumo de oxígeno total, $I_T$, a cada concentración de la sustancia problema se determina mediante la ecuación 7:

$$I_T = [1 - (R_T - R_{TA})/R_{TB}] \times 100\ \% \quad (7)$$

53. Análogamente, el porcentaje de inhibición de la absorción de oxígeno heterotrófica, $I_H$, a cada concentración de la sustancia problema se determina mediante la ecuación 8:

$$I_H = [1 - (R_H - R_{HA})/R_{HB}] \times 100\ \% \quad (8)$$

54. Finalmente, el porcentaje de inhibición de la absorción de oxígeno debida a la nitrificación, $I_N$, a cada concentración de la sustancia problema se determina mediante la ecuación 9:

$$I_N = [1 - (R_T - R_H)/(R_{TB} - R_{HB})] \times 100\ \% \quad (9)$$

55. El porcentaje de inhibición de la absorción de oxígeno se debe representar gráficamente frente al logaritmo de la concentración de la sustancia problema (curva de inhibición, véase la figura 3 del apéndice 4). Se representan las curvas de inhibición para cada período de aireación de 3 h o con carácter adicional después de 30 minutos. La concentración de la sustancia problema que inhibe la absorción de oxígeno en un 50 % ($EC_{50}$) debe calcularse o interpolarse a partir de la gráfica. Si se dispone de datos adecuados, pueden calcularse o interpolarse los límites de confianza del 95 % de la $EC_{50,}$ la pendiente de la curva y los valores adecuados para marcar el inicio de la inhibición (por ejemplo, $EC_{10}$ o $EC_{20}$) y el final del intervalo de inhibición (por ejemplo, $EC_{80}$ o $EC_{90}$).

56. Ha de señalarse que, en vista de las variaciones observadas con frecuencia en los resultados, en muchos casos puede ser suficiente expresar los resultados además por orden de magnitud, por ejemplo:

$EC_{50}$ < 1 mg/l

$EC_{50}$ 1 mg/l a 10 mg/l

$EC_{50}$ 10 mg/l a 100 mg/l

$EC_{50}$ > 100 mg/l

**Interpretación de los resultados**

*$EC_x$*

▼M6

57. Los valores de $EC_x$ junto con sus correspondientes límites de confianza del 95 % inferior y superior para el parámetro se calculan utilizando métodos estadísticos apropiados [por ejemplo, análisis de probit, función logística o de Weibull, método de Spearman-Karber recortado o interpolación simple (11)]. Se obtiene una $EC_x$ insertando en la ecuación encontrada un valor correspondiente al x % de la media del control. Para calcular la $EC_{50}$ o alguna otra $EC_x$, las medias por tratamiento (x) deben someterse a análisis de regresión.

*Estimación de la NOEC*

58. Cuando se pretende determinar la NOEC mediante análisis estadístico, es necesario disponer de estadísticas por recipiente (se considera que cada uno de los recipientes es una réplica). Se deben utilizar métodos estadísticos apropiados según el documento de la OCDE sobre *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (11). En general, los efectos adversos de la sustancia problema en comparación con el control se investigan utilizando contrastes de hipótesis unilaterales (más pequeños) a $p \leq 0{,}05$.

**Informe del ensayo**

59. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema*

— nombre común, nombre químico, número CAS, pureza;

— propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema (por ejemplo, log $K_{ow}$, hidrosolubilidad, presión de vapor, constante de Henry (H) y posible información sobre el destino de la sustancia problema como, por ejemplo, adsorción al lodo activado);

*Sistema de ensayo*

— procedencia, condiciones de funcionamiento de la planta de tratamiento de aguas residuales y afluente que recibe, concentración, pretratamiento y mantenimiento del lodo activado;

*Condiciones de ensayo*

— temperatura de ensayo, pH durante el ensayo y duración de la fase o fases de exposición;

*Resultados*

— consumo específico de oxígeno en los controles (mg $O_2$ /(g lodo × h);

— todos los datos medidos, curva o curvas de inhibición y método para calcular el valor de $EC_{50}$;

— $EC_{50}$ y, si es posible, límites de confianza del 95 por ciento, en su caso $EC_{20}$, $EC_{80}$; eventualmente, la NOEC y los métodos estadísticos utilizados, si no puede determinarse la $EC_{50}$;

— resultados de la inhibición total y, si procede, heterotrófica y de nitrificación;

— absorción abiótica de oxígeno en el control fisicoquímico (si se utiliza);

— nombre de la sustancia de referencia y resultados con la misma;

— todas las observaciones y desviaciones del procedimiento normal que puedan haber influido sobre el resultado.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Brown, D., Hitz, H.R. and Schäfer, L. (1981). The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic waste-water bacteria, Experience with a screening test. *Chemosphere* 10 (3): 245-261.

▼M6

(2) King, E. F. and Painter H. A. (1986). Inhibition of respiration of activated sludge; variability and reproducibility of results. *Toxicity Assessment* 1(1): 27-39.

(3) OCDE (1984). Activated sludge. Respiration inhibition test. Test Guideline No. 209, Guidelines for the testing of chemicals, OCDE, París.

(4) ISO (2007). ISO 8192. Calidad del agua. Ensayo de inhibición del consumo de oxígeno por lodos activados por oxidación del carbono y del amonio. Organización Internacional de Normalización.

(5) Bealing, D. J. (2003). Documento ISO/TC147/WGI/N.183, Organización Internacional de Normalización.

(6) Painter, H A, Jones K (1963). The use of the wide-bore dropping-mercury electrode for the determination of the rates of oxygen uptake and oxidation of ammonia by micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 26 (3): 471-483.

(7) Painter, H. A. (1986). Testing the toxicity of chemicals by the inhibition of respiration of activated sludge. *Toxicity Assessment* 1:515-524.

(8) Robra, B. (1976). Wasser/Abwasser 117, 80.

(9) Fiebig, S. and Noack, U. (2004). The use of copper(II)sulphate pentahydrate as reference substance in the activated sludge respiration inhibition test — acc. to the OECD guideline 209. *Fresenius Environmental Bulletin* 13 No. 12b: 1556-1557.

(10) ISO (1995). ISO 10634. Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso. Organización Internacional de Normalización.

(11) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application, Series on testing and assessment No. 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, París.

▼**M6**

*Apéndice 1*

**Definiciones**

En el presente método de ensayo se aplican las siguientes definiciones:

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**$EC_x$ (concentración con efecto al x %)**: concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado período de exposición cuando se compara con un control. Por ejemplo, una $EC_{50}$ es una concentración de la que se estima que causa un efecto sobre un parámetro de un ensayo en el 50 % de una población expuesta a lo largo de un determinado período de exposición.

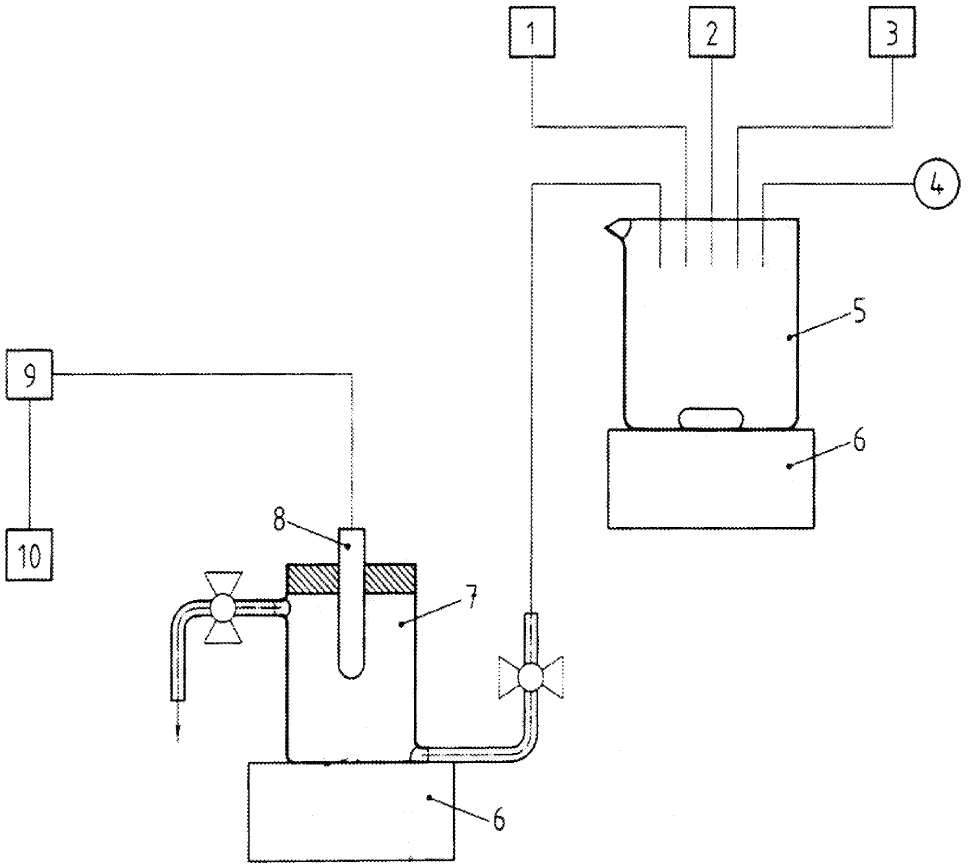
**NOEC (concentración sin efecto observado)**: concentración de la sustancia problema a la que no se observa ningún efecto. En este ensayo, la concentración correspondiente a la NOEC no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro de un determinado período de exposición en comparación con el control.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼**M6**

*Apéndice 2*

*Figura 1.* **Ejemplos de dispositivo de medición**



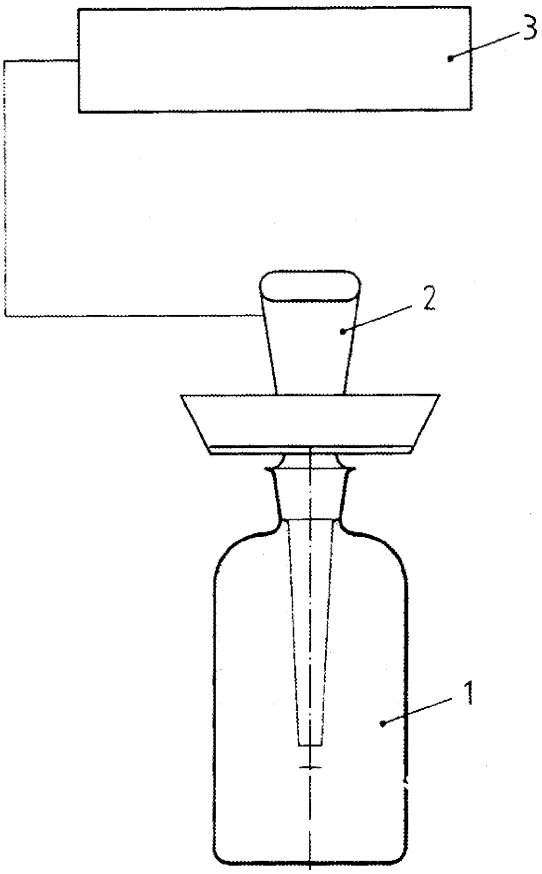

*Leyenda*

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | Lodo activado | 6 | Agitador magnético |
| 2 | Medio sintético | 7 | Celda de medición de oxígeno |
| 3 | Sustancia problema | 8 | Electrodo de oxígeno |
| 4 | Aire | 9 | Instrumento de medición de oxígeno |
| 5 | Recipiente de mezclado | 10 | Registrador |

▼**M6**

*Apéndice 3*

*Figura 2.* **Ejemplo de dispositivo de medición, con utilización de frasco de DBO**




*Leyenda*

1 Recipiente de ensayo

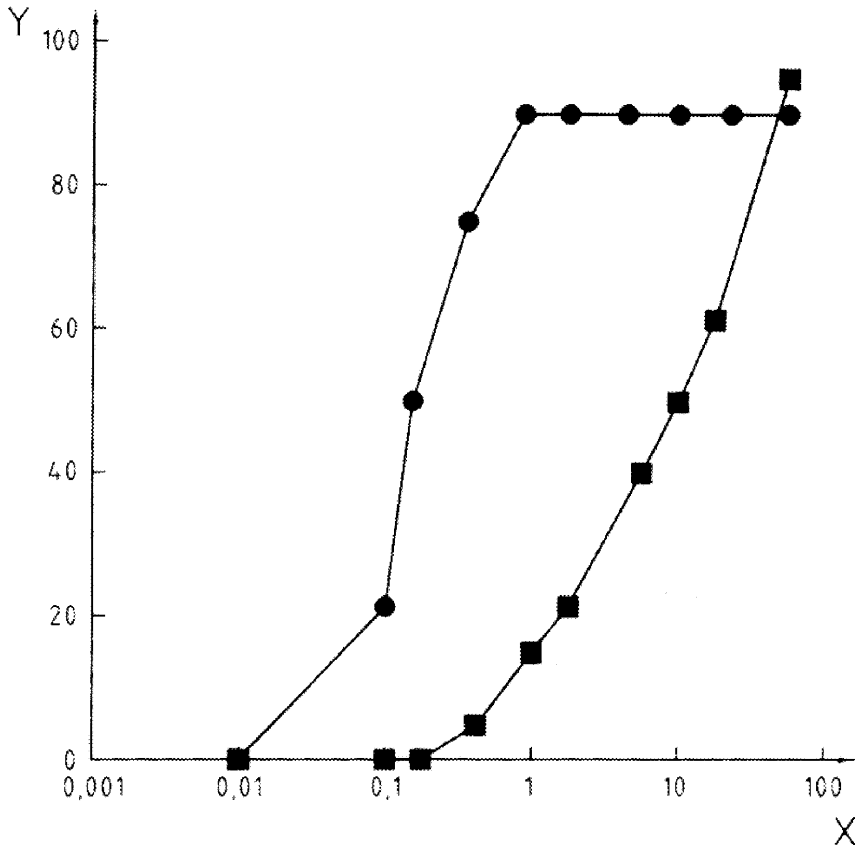
2 Electrodo de oxígeno

3 Instrumento de medición de oxígeno

▼**M6**

*Apéndice 4*

*Figura 3.* **Ejemplo de curvas de inhibición**




*Leyenda*

X Concentración de 3,5-diclorofenol (mg/l)

Y Inhibición (%)

■ inhibición de la respiración heterotrófica con un lodo nitrificante

● inhibición de la nitrificación con un lodo nitrificante.

▼B

C.12. **BIODEGRADACIÓN**

PRUEBA LASC MODIFICADA

1. **MÉTODO**

1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo del método es la evaluación del potencial de biodegradabilídad última o total de sustancias orgánicas hidrosolubles y no-volátiles, cuando se exponen a concentraciones relativamente altas de microorganismos durante un largo período de tiempo. Se mantiene durante este período la viabilidad de los microorganismos añadiendo diariamente una alimentación de aguas residuales decantadas. Para las necesidades del fin de semana, pueden almacenarse las aguas residuales a 4 °C. Pueden emplearse como alternativa las aguas residuales sintéticas de la prueba de confirmación OCDE.

Puede producirse una absorción fisicoquímica sobre los sólidos en suspensión, y este hecho deberá tomarse en cuenta al interpretar los resultados (véase el punto 3.2).

Debido al largo período de retención de la fase líquida (36 horas) y a la adición intermitente de nutrientes, la prueba no simula las condiciones reinantes en una planta depuradora de aguas residuales. Los resultados obtenidos con diversas sustancias de prueba indican que la prueba tiene un elevado potencial de biodegradación.

Las condiciones que la prueba establece son muy favorables a la selección y/o adaptación de microorganismos capaces de degradar el compuesto de prueba (el procedimiento puede utilizarse también para obtener inóculos aclimatados destinados a emplearse en otras pruebas).

En este método se emplea la medida de la concentración del carbono orgánico disuelto para evaluar la biodegradabilidad total de las sustancias de prueba. Resulta preferible determinar el COD por acidificación y purgado más que por la diferencia de $C_{total}$-$C_{iriorginico.}$.

El empleo simultáneo de un método analítico específico puede permitir también evaluar la degradación primaria de la sustancia (desaparición de la estructura química madre).

El método solo es aplicable a las sustancias orgánicas de prueba que, a la concentración empleada en la prueba,

— sean solubles en agua, (como mínima, 20 mg de carbono orgánico dísuelto/l),

— posean una presión de vapor despreciable,

— no posean efecto inhibidor sobre las bacterias,

— no se absorban significativamente dentro del sistema de prueba,

— no escapen de la solución de prueba por formación de espumas.

Deberá determinarse el contenido de carbono orgánico del material de prueba.

▼B

Para interpretar los resultados obtenidos, será útil la información sobre las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia de prueba, particularmente en los casos para los que los resultados sean bajos o marginales.

Para la interpretación de resultados bajos y para la selección de una concentración de prueba idónea podrá ser útil la información sobre la toxicidad de la sustancia de prueba para los microorganismos.

1.2. DEFINICIONES DE U NIDADES

$C_T$ = concentración del compuesto de prueba como carbono orgánico presente o añadido a las aguas residuales sedimentadas al comienzo del período de aireación (mg/l).

$C_2$ = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante de la prueba al término del período de aireación (mg/l).

$C_c$ = concentración del carbono orgánico disuelto, encontrada en el líquido sobrenadante del control al término del período de aireación (mg/l).

En este método, la biodegradación se define como la desaparición del carbono orgánico. La biodegradación puede expresarse como:

1. La eliminación porcentual $D_{2d}$ de la cantidad de sustancia añadida diariamente;

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

$D_{ad}$ = degradación/adición diaria.

2. La eliminación porcentual $D_{id}$ de la cantidad de sustancia presente al inicio de cada día:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

$D_{sid}$ = degradación/substancia al inicio del día.

Donde los índices i e (i + 1) se refieren al día de la medición.

Se recomienda la ecuación [2 a)] si el COD efluente varía de día a día, mientras que la ecuación [2 b)] puede emplearse cuando el COD efluente permanezca relativamente constante de un día para otro.

▼B

1.3. SUSTANCIAS DE REFERENCIA

En algunos casos, al investigar una sustancia nueva, serán útiles las sustancias de referencia; sin embargo, no se recomienda en el método ninguna sustancia de referencia específica.

Se proporcionan los datos de diversos compuestos evaluados en pruebas efectuadas en varios laboratorios (véase el anexo 1). En principio esto puede ser llevado a cabo periódicamente como calibración del método y para comparar los resultados obtenidos cuando se emplea un método distinto.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE LA PRUEBA

Se coloca en una unidad de lodo activado semicontinuo (LASC) lodo activado procedente de una planta depuradora de aguas residuales. Se añaden el compuesto de prueba y aguas residuales domésticas decantadas, aireándose la mezcla durante 23 horas. Se interrumpe entonces la aireación, permitiéndose que el lodo se deposite por sedimentación y retirándose el líquido sobrenadante.

Se mezcla a continuación el lodo que permanece en la cámara de aireación con una cantidad igual del compuesto de prueba y de aguas residuales, repitiéndose el ciclo.

La biodegradación se determina por el contenido en carbono orgánico disuelto del líquido sobrenadante. Se compara dicho valor con el obtenido en un tubo de control en el que se han introducido solo aguas residuales decantadas.

Cuando se utiliza un método analítico específico, pueden medirse los cambios en la concentración de la molécula madre debidos a la biodegradación (biodegradabilidad primaria).

1.5. CRITERIOS DE CALIDAD

No ha sido bien establecida aún la reproducibilidad de este método basado en la eliminación del carbono orgánico disuelto (cuando se considera la biodegradación primaria, se obtienen datos muy precisos para las sustancias degradadas en gran medida),

La sensibilidad del método viene determinada en gran parte por la variabilidad del control y, en menor grado, por la precisión de la determinación del carbono orgánico disuelto y por el contenido del compuesto de prueba en el líquido al comienzo de cada ciclo.

1.6. DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1.6.1. *Preparativos*

Se reúne un número suficiente de unidades limpias de aireación (también puede usarse alternativamente la unidad original de prueba LASC de 1,5 l) y de tubos de entrada de aire (figura 1) para cada sustancia de prueba *y* para los controles. El aire comprimido suministrada a las unidades de prueba, que se purifica pasándolo por un filtro de lana de algodón, debe hallarse exento de carbono orgánico y presaturado con agua, a fin de reducir las pérdidas por evaporación.

Se toma una muestra de líquido mixto, que contenga de 1 a 4 g de sólidos en suspensión por litro de una central depuradora de lodo activado en la que se depuren sobre todo aguas residuales domésticas. Para cada unidad de aireación se requieren aproximadamente 150 ml de líquido mixto.

▼B

Se preparan en agua destilada soluciones madre de la sustancia de prueba; la concentración exigida normalmente es de 400 mg/l como carbono orgánico, lo que supone una concentración del compuesto de prueba de 20 mg/l de carbono al inicio de cada ciclo de aireación, si no tiene lugar una biodegradación.

Pueden emplearse concentraciones más altas si la toxicidad frente a los microorganismos lo permite.

Se mide el contenido en carbono orgánico de las soluciones madre.

1.6.2. *Condiciones de la prueba*

La prueba deberá llevarse a cabo a 20 a 25 $^{o}$C.

Se utiliza una concentración elevada de microorganismos aerobios (de 1 a 4 g/l de sólidos en suspensión), y el período efectivo de retención es de 36 horas. La materia carbonada existente en las aguas residuales que sirven de alimentación resulta oxidada en gran medida, normalmente al cabo de 8 horas tras el inicio de cada ciclo de aireación. A continuación, el lodo respira endógenamente durante el resto del período de aireación, siendo entonces el compuesto de prueba el único sustrato disponible, a menos que este resulte también rápidamente metabolizado. Estos factores, junto con el de la reinoculación diaria de la solución de prueba cuando se utilizan como medio aguas residuales domesticas, ofrecen condiciones muy favorables para que se produzcan la aclimatación y un alto grado de biodegradación.

1.6.3. *Ejecución de la prueba*

Se toma una muestra de líquido mixto de una estación de depuración de lodo activado predominantemente de origen doméstico, ó bien de un laboratorio, y se mantiene en condiciones aerobias hasta emplearla en el laboratorio. Se llena cada unidad de aireación, y la unidad de control, con 150 ml (si se utiliza la unidad original de' prueba LASC, deben multiplicarse los volúmenes dados por 10) de líquido mixto, y se da inicio a la aireación. Transcurridas 23 horas, se interrumpe la aireación y se permite que el lodo sedimente durante 45 minutos. Se abre sucesivamente la espita de cada recipiente, y se retiran de cada uno 100 ml del líquido sobrenadante. Se toma, inmediatamente antes de su uso, una muestra de aguas residuales domésticas decantadas y se añaden 100 ml al lodo que permanece en cada unidad de aireación. Se vuelve a comenzar la aireación. En esta fase no se añaden sustancias de prueba, y las unidades se alimentan diariamente con aguas residuales domésticas solo hasta que se obtenga un líquido sobrenadante transparente después de la decantación. El tiempo necesario para ello es por lo general de 2 semanas, transcurridas las cuales el carbono orgánico disuelto contenido en el líquido sobrenadante al término de cada ciclo de aireación se acerca a un valor constante,

Al término de este período, se mezclan Jos diferentes lodos decantados, y se añaden a cada unidad 50 mL del lodo compuesto resultante.

Se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de agua a las unidades control; por su parte, a las unidades de ensayo se añaden 95 ml de aguas residuales decantadas y 5 ml de la solución madre (400 mg/l) del compuesto en estudio. Se recomienza la aireación y se mantiene durante 23 horas. Se deja entonces que el lodo decante durante 45 minutos, recogiéndose a continuación el líquido sobrenadante y analizándose el mismo, a fin de establecer su contenido en carbono orgánico disuelto.

Se repite diariamente durante toda la duración de la prueba el procedimiento mencionado de llenado y recogida.

▼B

Antes de la sedimentación, puede resultar necesario limpiar las paredes de las unidades para impedir que se acumulen sólidos por encima del nivel de líquido. Se utiliza para cada unidad un raspador o un cepillo individual, a fin de impedir que se produzca una contaminación cruzada.

Idealmente, eí carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes se determinará diariamente, aunque puede permitirse una frecuencia menor de análisis. Antes de efectuar el análisis, se filtran los líquidos a través de filtros de membrana de 0,45 μm lavados o se centrifugan los mismos. Los filtros de membrana son adecuados si es seguro que ni liberan carbono ni absorben sustancia en la fase de filtración. La temperatura de la muestra no debe superar los 40 $^{o}$C mientras se halle dentro de la centrífuga.

La duración de la prueba para compuestos con poca o ninguna degradación es indeterminada, pero la experiencia sugiere que generalmente debería alcanzar al menos 12 semanas, sin superar las 26.

2. **DATOS Y EVALUACIÓN**

Se representan en un diagrama frente al tiempo, los valores del carbono orgánico disuelto en los líquidos sobrenadantes de las unidades de prueba y de las unidades de control.

Según se va produciendo la biodegradación, el nivel encontrado en la muestra se aproximará al nivel del control. Una vez que la diferencia entre los dos niveles resulta constante para tres medidas consecutivas, se efectúa el número de medidas adicionales que sea suficiente para permitir el tratamiento estadístico de los datos, y se calcula con ellos la biodegradación porcentual del compuesto de prueba ($D_{ad}$ o $D_{sid}$, véase el punto 1.2).

3. **INFORME**

3.1. INFORME DE LA PRUEBA

El informe sobre el ensayo incluirá, si fuera posible:

— toda la información sobre el tipo de aguas residuales, el tipo de unidad empleado y los resultados experimentales relativos a la sustancia probada, la sustancia de referencia (si se usa), y el control,

— la temperatura,

— la curva de eliminación, con descripción y método de cálculo (véase 1,2),

— la fecha y el emplazamiento donde se tomó la muestra del lodo activado y de las aguas residuales, el estado de adaptación, concentración, etc.,

— razones científicas para efectuar cualquier modificación del procedimiento de la prueba,

— firma y fecha.

▼B

3.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Dado que la sustancia que deberá probarse con este método no será fácilmente biodegradable, toda eliminación del COD debida exclusivamente a la biodegradación será normalmente gradual, extendiéndose durante días o semanas, excepto en los casos en los que la aclimatación sea brusca, como indica una desaparición abrupta que tenga lugar tras algunas semanas.

Sin embargo, la absorción fisicoquímica puede jugar en ocasiones un papel importante; esto se apreciará cuando se produzca desde el principio una eliminación completa o parcial del COD añadido. Lo que sucede a continuación depende de factores tales como los grados de absorción y la concentración de sólidos en suspensión en la descarga del efluente. Generalmente, la diferencia entre las concentraciones del COD en los líquidos de control y en los líquidos sobrenadantes de la prueba se incrementa gradualmente a partir de un valor inicial bajo, permaneciendo a continuación con el nuevo valor durante el resto del experimento a menos que tenga lugar la aclimatación.

Si debe llevarse a cabo una distinción entre la biodegradación (o la biodegradación parcial) y la absorción, son necesarias otras pruebas. Estas pueden efectuarse de diversas maneras, pero la más convincente consiste en utilizar el líquido sobrenadante, o el lodo, como inóculo para una prueba de grupo base (preferiblemente una prueba respirométrica).

Las sustancias de prueba que produzcan una eliminación alta y no adsortiva del COD en esta prueba deberán considerarse como potencialmente biodegradables. La eliminación parcial y no adsortiva indica que el producto químico experimenta al menos algo de biodegradación.

Las eliminaciones bajas o nulas del COD pueden ser debidas a que la sustancia de prueba tiene efecto inhibidor sobre los microorganismos, y esto puede quedar de manifiesto también por lisis y pérdida de lodo, produciéndose sobrenadantes turbios. En este caso, deberá repetirse la prueba empleando una concentración menor de la sustancia de prueba.

El empleo de un método analítico específico, o de una sustancia de prueba marcada con $^{14}C$ puede proporcionar una mayor sensibilidad. En el caso del compuesto de prueba marcado con $^{14}C$, la recuperación de $^{14}CO_2$ confirmará que ha tenido lugar la biodegradación.

Cuando los resultados se expresen también en términos de biodegradación primaria, deberá explicarse también, si ello es posible, el cambio en la estructura química que produce la pérdida de respuesta de la sustancia inicial de prueba.

Deberá indicarse la validación del método analítico junto con la respuesta encontrada con el medio del control.

4. **REFERENCIAS**

(1) OCDE, París, 1981, *Directriz para pruebas 302 A,* Decisión del Consejo C(81) 30 final.

▼B

*Apéndice 1*

**Prueba LASC: Ejemplo de resultados**

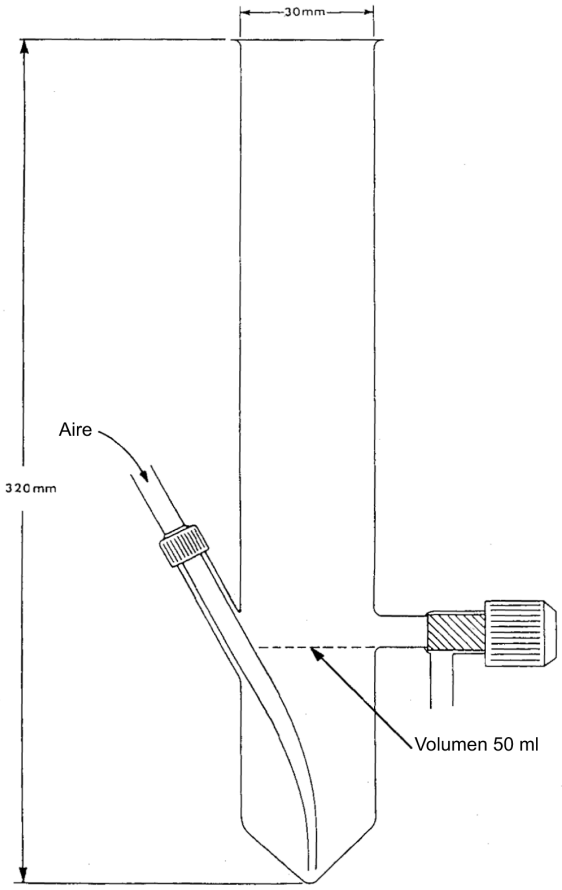
| Sustancia | $C_T$ (mg/l) | $C_T$-$C_e$ (mg/l) | Porcentaje de biodegradación ($D_{od}$) | Duración del ensayo (días) |
|---|---|---|---|---|
| 4-acetil aminobenceno sulfonato | 17,2 | 2,0 | 85,0 | 40 |
| Tetra propilen benceno sultanato | 17,3 | 8,4 | 51,4 | 40 |
| 4-nitrofenil | 16,9 | 0,8 | 95,3 | 40 |
| Dieril glicol | 16,5 | 0,2 | 98,8 | 40 |
| Anilina | 16,9 | 1,7 | 95,9 | 40 |
| Tetra ciclopentano carboxilato | 17,9 | 3,2 | 81,1 | 120 |

▼B

*Apéndice 2*

**Ejemplo del aparato de ensayo**

*Figure 1*



▼M7

## C.13. **BIOACUMULACIÓN EN PECES: EXPOSICIÓN ACUÁTICA Y ALIMENTARIA**

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) de la OCDE 305 (2012). El objetivo principal de la presente revisión del método de ensayo es doble. En primer lugar, se propone incorporar un ensayo de bioacumulación alimentaria ([1]) apropiado para determinar el potencial de bioacumulación de sustancias con hidrosolubilidad muy baja. En segundo lugar, se pretende crear un método de ensayo que, cuando proceda, utilice menos peces por motivos de bienestar de los animales, y que sea económicamente más rentable.

En los años transcurridos desde la aprobación del método de ensayo consolidado C.13 (1), se han sometido a ensayo numerosas sustancias, y han acumulado considerable experiencia tanto los laboratorios como las autoridades normativas. Esto ha llevado a la convicción de que la complejidad del ensayo puede reducirse si se cumplen unos criterios específicos (véase el punto 88), y de que es posible un enfoque escalonado. La experiencia también ha demostrado que ciertos factores biológicos, como el crecimiento y el contenido lipídico de los peces, pueden tener un fuerte impacto sobre los resultados y puede ser necesario tenerlos en cuenta. Además, se ha reconocido que puede no ser técnicamente viable el ensayo de sustancias muy poco hidrosolubles. Además, en el caso de las sustancias muy poco hidrosolubles en el medio acuático, la exposición a través del agua puede ser de importancia limitada en comparación con la vía alimentaria. Esto ha dado lugar a la elaboración de un método de ensayo en el que los peces se exponen a través de su alimentación (véanse los puntos 7-14 y a partir del 97). En 2010 se procedió a una validación (prueba interlaboratorios) de la exposición alimentaria (51).

Los principales cambios son los siguientes:

— La utilización de una sola concentración de ensayo puede considerarse suficiente, si resulta probable que el factor de bioconcentración (FBC) es independiente de la concentración de ensayo.

— Un diseño minimizado del ensayo de exposición acuática, en el que es posible un número reducido de puntos de muestreo, si se cumplen unos criterios específicos.

— Debe medirse el contenido lipídico de los peces, de forma que pueda expresarse el FBC referido a un contenido lipídico del 5 %.

— Mayor hincapié en la estimación del FBC cinético (cuando sea posible) además de calcular el FBC en el estado de equilibrio.

— Para determinados grupos de sustancias, se propondrá un ensayo de exposición alimentaria, si se considera más adecuado que un ensayo de exposición acuática.

— Debe medirse el peso de los peces, de forma que el $FBC_k$ pueda corregirse en función de la dilución por el crecimiento.

Antes de llevar a cabo ninguno de los ensayos de bioacumulación, debe conocerse la siguiente información acerca de la sustancia problema:

a) Sensibilidad de la técnica analítica para medir las concentraciones de la sustancia problema y sus posibles metabolitos en los tejidos, en el agua o en los alimentos (véase el punto 65);

b) Hidrosolubilidad [método A.6; (2)]; debe determinarse según un método adecuado para el intervalo (estimado) de la solubilidad para obtener un valor fiable; en el caso de las sustancias hidrófobas, será generalmente el método de elución en columna;

([1]) Véanse en el apéndice 1 las definiciones y unidades.

▼M7

c) Coeficiente de reparto n-octanol/agua $K_{OW}$ ([1]) [métodos A.8 (4), A.24 (5) y A.23 (6)], u otra información adecuada sobre el comportamiento en cuanto al reparto (p. ej., sorción en lípidos, $K_{OC}$); debe determinarse según un método adecuado para el intervalo (estimado) del $K_{OW}$ para obtener un valor fiable; en el caso de las sustancias hidrófobas, será generalmente el método de agitación lenta [método A.23 (6)];

d) Estabilidad de la sustancia en agua (hidrólisis [método C.7 (7)]);

e) Estabilidad de la sustancia en los alimentos (específicamente cuando se elige un ensayo de exposición alimentaria);

f) Información sobre la fototransformación pertinente para las condiciones de irradiación del ensayo (8);

g) Tensión superficial (para las sustancias cuyo log $K_{OW}$ no puede determinarse) [método A.5 (9)];

h) Presión de vapor [método A.4 (10)];

i) Eventual información sobre la degradación biótica o abiótica en agua, como por ejemplo la biodegradabilidad fácil [métodos C.4, partes II a VII (11), C.29 (12)], cuando sea pertinente;

j) Información sobre los metabolitos: estructura, log $K_{OW}$, formación y degradabilidad, cuando proceda;

k) Constante de disociación ácida (p$K_a$) de las sustancias que puedan ionizarse; en caso necesario, el pH del agua de ensayo debe ajustarse de manera que la sustancia se encuentre en el ensayo en la forma no ionizada si es compatible con las especies de peces.

Independientemente del método de exposición o de la pauta de muestreo que se hayan elegido, el presente método de ensayo describe un procedimiento para caracterizar el potencial de bioacumulación de las sustancias en los peces. Aunque son muy preferibles los regímenes de ensayos dinámicos, los regímenes semiestáticos son aceptables a condición de que se cumplan los criterios de validez (véanse los puntos 24 y 113). En la vía de exposición alimentaria, el sistema dinámico no es necesario para mantener las concentraciones acuosas de la sustancia problema, pero contribuye a mantener las concentraciones adecuadas de oxígeno disuelto y a mantener el agua limpia y eliminar las influencias de, por ejemplo, los productos de excreción.

Independientemente del método de ensayo elegido, en el presente método de ensayo se da suficiente información para realizarlo, dejando bastante libertad para adaptar el diseño experimental a las condiciones específicas de cada laboratorio y para variar las características de las sustancias problema. El ensayo de exposición acuática se aplica de forma más adecuada a las sustancias orgánicas estables con valor de log $K_{OW}$ entre 1,5 y 6,0 (13) pero también es aplicable a las sustancias muy hidrófobas (con log $K_{OW} > 6,0$), si puede demostrarse una concentración estable y totalmente disuelta de la sustancia problema en agua. Si no puede demostrarse una concentración estable de la sustancia problema en agua, no será adecuado el ensayo acuático; por tanto, será necesario seguir el enfoque alimentario para el ensayo de la sustancia en los peces (aunque la interpretación y el uso de los resultados del ensayo alimentario pueden depender del marco reglamentario). Mediante la ecuación de Bintein *et al.* (14) se pueden

([1]) Expresado a veces como $P_{OW}$; se determina por un método de frasco de agitación en el método A.8 (4), un método de HPLC en el método A.24 (5) y un método de agitación lenta en el método A.23 (6). La técnica de la columna generadora se utiliza ocasionalmente para la determinación del log $K_{OW}$. Se dispone de un número limitado de estudios que hacen uso de esta técnica, principalmente para los clorobifenilos y las dibenzodioxinas cloradas (por ejemplo, Li and Doucette, 1993) (3). En el caso de las sustancias que podrían ionizarse, el log $K_{OW}$ debe referirse a la forma no ionizada.

▼M7

obtener valores pre-estimados del factor de bioconcentración (FBC, a veces expresado como $K_B$) de sustancias orgánicas con valores de log $K_{OW}$ de hasta alrededor de 9,0. El valor pre-estimado del factor de bioconcentración de tales sustancias muy hidrófobas puede ser mayor que el valor del factor de bioconcentración en estado de equilibrio ($FBC_{SS}$) que se puede esperar en un experimento de laboratorio, especialmente cuando se utiliza un modelo lineal simple para el valor pre-estimado. Entre los parámetros que caracterizan el potencial de bioacumulación se encuentran la constante de la velocidad de absorción ($k_1$), las constantes de la velocidad de pérdida que incluyen la constante de la velocidad de depuración ($k_2$), el factor de bioconcentración en el estado de equilibrio ($FBC_{SS}$), el factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) y el factor de biomagnificación alimentario (FBM) ([1]).

Puede facilitarse el análisis de las muestras de agua, alimentos y peces con ayuda de sustancias problema radiomarcadas, que pueden también servir para determinar si se deben identificar y cuantificar los metabolitos. Si solo se miden los residuos radiactivos totales (por ejemplo, por combustión o solubilización de los tejidos), el FBC o FBM se basa en el total de la sustancia original, en los eventuales metabolitos retenidos y también en el carbono asimilado. Así pues, los valores del FBC o FBM basados en los residuos radiactivos totales no pueden ser directamente comparables a los valores de FBC o FBM derivados de un análisis químico específico solo de la sustancia original. Pueden aplicarse procedimientos de separación, como la TLC, HPLC o GC ([2]), antes del análisis en estudios radiomarcados para determinar el FBC o el FBM basados en la sustancia original. Cuando se aplican tales técnicas de separación, debe efectuarse la identificación y cuantificación de la sustancia original y de los metabolitos pertinentes ([3]) (véase el punto 65) si se quiere que el FBC o FBM se base en la concentración de la sustancia original en los peces y no en la del total de residuos radiomarcados. También se puede combinar un estudio del metabolismo de los peces o de la distribución *in vivo* con un estudio de bioacumulación por análisis e identificación de los residuos en los tejidos. La posibilidad del metabolismo se puede predecir mediante instrumentos adecuados [por ejemplo, herramientas sobre la relación estructura-actividad de la OCDE (OECD QSAR toolbox) (15) y programas de QSAR protegidos].

La decisión de si llevar a cabo un ensayo de exposición acuática o alimentaria, y en qué configuración debe basarse en los factores del punto 3, considerados junto con el marco normativo pertinente. Por ejemplo, en el caso de las sustancias que tienen un valor elevado de log $K_{OW}$ pero presentan hidrosolubilidad apreciable con respecto a la sensibilidad de las técnicas analíticas disponibles, debe considerarse en primera instancia un ensayo de exposición acuática. No obstante, es posible que la información sobre la hidrosolubilidad no sea definitiva para estos tipos de sustancias hidrófobas, por lo que, antes de tomar una decisión sobre qué método de ensayo utilizar, debe investigarse la posibilidad de preparar en agua concentraciones disueltas, estables y mensurables (no se permiten emulsiones estables) aplicables a un estudio de exposición acuática (16). No es posible dar orientaciones normativas exactas en relación con el método que debe usarse, solo sobre la base de criterios de corte como la hidrosolubilidad y el coeficiente de reparto octanol/agua, ya que otros factores (técnicas analíticas, degradación, adsorción, etc.) pueden tener una influencia marcada en la aplicabilidad del método por las razones anteriormente expuestas. No obstante, un log $K_{OW}$ superior a 5 y una hidrosolubilidad por debajo de ~ 0,01-0,1 mg/l marcan la gama de sustancias en las que los ensayos por exposición acuática pueden ser cada vez más difíciles.

Deben considerarse los demás factores que puedan influir en la elección del ensayo, incluido el potencial de adsorción de la sustancia a los recipientes y aparatos del ensayo, su estabilidad en solución acuosa frente a su estabilidad en los alimentos de los peces (17) (18), etc.

Puede encontrarse información sobre estos aspectos prácticos en otros estudios completados en agua. En la bibliografía se dispone de más información sobre la evaluación de los aspectos vinculados al comportamiento de los estudios de bioacumulación (véase, p. ej., (19)).

Respecto a aquellas sustancias con las cuales la solubilidad o el mantenimiento de la concentración en el agua, así como el análisis de estas concentraciones, no

([1]) Véanse en el apéndice 1 las definiciones y unidades.
([2]) TLC: cromatografía de capa fina; HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución; CG: cromatografía de gases.
([3]) En algunos marcos reguladores, el análisis de los metabolitos puede ser obligatorio cuando se cumplen ciertas condiciones (véase el punto 65).

▼M7

plantean ninguna restricción a la utilización de un método de exposición acuática, es preferible utilizar este método para determinar el potencial de bioconcentración de la sustancia. En cualquier caso, debe verificarse que la concentración o concentraciones para exposición acuática que deben aplicarse están dentro del margen de solubilidad en el medio de ensayo. Pueden utilizarse diferentes métodos para mantener estable la concentración de la sustancia problema disuelta, como el uso de soluciones madre o de sistemas de administración pasiva (por ejemplo, método de elución en columna), siempre que pueda demostrarse que las concentraciones pueden mantenerse estables y que los medios de ensayo no se alteran respecto a los recomendados en el punto 27.

Con sustancias muy hidrófobas (log $K_{OW}$ > 5 y solubilidad inferior a ~ 0,01-0,1 mg/l), los ensayos por exposición acuática pueden ser cada vez más difíciles. Entre los motivos de las restricciones están el que la concentración en el que no pueda mantenerse a un nivel que se considere suficientemente constante (por ejemplo, debido a la sorción al vidrio de los recipientes de exposición o una rápida absorción por los peces) o el que las concentraciones acuosas que se deban aplicar sean tan bajas que se sitúen en el mismo intervalo que el límite analítico de cuantificación o por debajo de él [1]. Con estas sustancias muy hidrófobas se recomienda el ensayo alimentario, siempre que el ensayo sea coherente con el marco reglamentario pertinente y las necesidades de evaluación de riesgos.

En el caso de los agentes tensioactivos, se debe considerar si es factible el ensayo de bioconcentración acuosa, habida cuenta de las propiedades de la sustancia; en caso contrario, el estudio alimentario es probablemente más adecuado. Los agentes tensioactivos actúan sobre la tensión superficial y reducen la tensión interfacial entre dos líquidos. Su naturaleza anfifílica (es decir, contienen una parte hidrófila y una parte hidrófoba) hace que se acumulen en los interfaces como, por ejemplo, la interfaz agua-aire, la interfaz agua-alimento, y las paredes de vidrio, lo que dificulta la determinación de su concentración en el agua.

El ensayo alimentario permite superar algunos de los aspectos de la exposición en caso de mezclas complejas con componentes de diferentes límites de hidrosolubilidad, ya que es más probable conseguir una exposición comparable a todos los componentes de la mezcla que con el método acuático (véase (20)).

Debe señalarse que el planteamiento alimentario arroja un factor de biomagnificación alimentario (FBM) en lugar de un factor de bioconcentración (FBC) [2]. Se dispone de enfoques para calcular un factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) a partir de datos obtenidos en el estudio alimentario (como se indica en el apéndice 8), pero estos enfoques se deben utilizar con prudencia. En general, asumen una cinética de primer orden, y son aplicables solo a determinados grupos de compuestos. Es poco probable que este tipo de enfoques pueda aplicarse en el caso de los agentes tensioactivos (véase el punto 12).

Una configuración minimizada de ensayo de exposición acuática con menos puntos de muestreo para reducir el número de animales o recursos (véase a partir del punto 83) solo debe aplicarse a aquellas sustancias con las que haya motivos para esperar que la absorción y la depuración sigan una cinética aproximadamente de primer orden (es decir, en general, sustancias orgánicas no ionizadas, véase el punto 88).

## C.13 — I: **ENSAYO DE BIOCONCENTRACIÓN EN PECES CON EXPOSICIÓN ACUÁTICA**

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo se divide en dos fases: la de exposición (absorción) y la posterior a la exposición (depuración). Durante la fase de absorción, un grupo de peces de una sola especie queda expuesto a la sustancia problema a una o varias concentraciones elegidas, en función de las propiedades de la sustancia problema (véase el punto 49). Luego se transfieren a un medio libre de esta sustancia, para la fase de

[1] En general, las concentraciones medidas en agua durante la fase de absorción deben ser, como mínimo, de un orden de magnitud por encima del límite de cuantificación para que pueda medirse más de una semivida de carga corporal en la fase de depuración del estudio.

[2] Véanse en el apéndice 1 las definiciones y unidades.

▼M7

depuración. Esta última fase es necesaria siempre, excepto cuando la absorción de la sustancia durante la fase de absorción ha sido insignificante. La concentración de la sustancia problema en los peces (o en tejidos específicos) se mide durante las dos fases del ensayo. Además del grupo expuesto a la sustancia problema, se mantiene un grupo testigo de peces en condiciones idénticas, salvo que no se expone a la sustancia problema, para relacionar los posibles efectos nocivos observados en el ensayo de bioconcentración con un grupo testigo correspondiente, y deducir las concentraciones de fondo de la sustancia problema ([1]).

En el ensayo de exposición acuática, la fase de absorción tiene generalmente una duración de 28 días. La duración puede aumentarse en caso necesario (véase el punto 18), o reducirse si se demuestra que se ha alcanzado antes el estado de equilibrio (véase el apéndice 1, Definiciones y unidades). Puede preverse la duración de la fase de absorción y el tiempo necesario para la obtención del estado de equilibrio gracias a las ecuaciones del apéndice 5. El periodo de depuración comienza entonces, cuando los peces dejan de exponerse a la sustancia problema, con la transferencia de los peces a un recipiente limpio con el mismo medio, pero sin la sustancia problema. Cuando sea posible, se calcula el factor de bioconcentración preferentemente como proporción de la concentración en los peces ($C_f$) y en el agua ($C_w$) en el estado de equilibrio ($FBC_{SS}$; véase la definición en el apéndice 1) y como factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$; véanse las definiciones y unidades del apéndice 1), que se calcula como la proporción de las constantes de velocidad de absorción ($k_1$) y depuración ($k_2$) suponiendo cinética de primer orden ([2]).

Si no se llega al estado de equilibrio en 28 días, se calcula el FBC utilizando el enfoque cinético (véase el punto 38) o se puede ampliar la fase de absorción. En caso de que para alcanzar el estado de equilibrio sea necesaria una fase de absorción de longitud excesiva en la práctica (véanse los puntos 37 y 38, apéndice 5), será preferible el enfoque cinético. Como alternativa, en el caso de las sustancias muy hidrófobas debe considerarse la realización de un estudio alimentario ([3]), a condición de que el ensayo alimentario sea compatible con el marco normativo pertinente.

La constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de depuración (pérdida) (o las constantes, cuando entren en juego modelos más complejos), el factor de bioconcentración (en el estado de equilibrio y/o cinético) y, si es posible, los intervalos de confianza de cada uno de estos parámetros, se calculan a partir del modelo que describa mejor las concentraciones medidas de la sustancia problema en los peces y en el agua (véase el apéndice 5).

El aumento de la masa de los peces durante el ensayo se traducirá en una disminución de la concentración de la sustancia problema en los peces en crecimiento (la denominada dilución debida al crecimiento) y, por tanto, el FBC cinético estará subestimado si no se corrige para tener en cuenta este fenómeno (véanse los puntos 72 y 73).

El FBC se basará en la concentración total en los peces (es decir, respecto al peso húmedo total de los peces). Sin embargo, para algunos estudios pueden utilizarse tejidos u órganos específicos (por ejemplo, músculos, hígado) si los peces son suficientemente grandes o si es posible separar las partes comestibles (filetes) y no comestibles (vísceras). Como hay una clara relación entre el potencial de bioconcentración y la hidrofobicidad de numerosas sustancias orgánicas, también hay una relación correspondiente entre el contenido lipídico de los peces del ensayo y las bioconcentraciones observadas de tales sustancias. Así pues, para reducir esta fuente de variabilidad en los resultados de los ensayos relativos a las sustancias con fuerte lipofilia (es decir, con log $K_{OW} > 3$), la bioconcentración debe expresarse normalizada con referencia a un contenido

([1]) Con la mayoría de las sustancias problema, no debería detectarse nada en el agua del testigo. Las concentraciones de fondo deben ser pertinentes solo en el caso de los materiales naturales (por ejemplo, algunos metales) y de las sustancias que son ubicuas en el medio ambiente.

([2]) Si resulta evidente que no se sigue una cinética de primer orden, entonces convendrá utilizar modelos más complejos (véanse las referencias en el apéndice 5) y buscar el consejo de un bioestadístico.

([3]) La absorción puede verse limitada por unas bajas concentraciones de exposición debidas a la escasa hidrosolubilidad en el ensayo de bioconcentración, mientras que con el ensayo alimentario pueden conseguirse concentraciones de exposición mucho mayores.

▼M7

lipídico de los peces del 5 % (sobre la base del peso corporal húmedo entero) además de la obtenida directamente del estudio. Esto es necesario para proporcionar una base sobre la cual puedan compararse entre sí los resultados de las distintas sustancias o con diferentes especies de ensayo. La cifra de 5 % de contenido lipídico es de amplia utilización, ya que se trata de la media del contenido lipídico de los peces utilizados comúnmente en el presente método de ensayo (21).

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Además de las propiedades de la sustancia problema que figuran en la introducción (punto 3), será necesario también conocer su toxicidad para la especie de peces utilizada en el ensayo, preferiblemente la $LC_{50}$ asintótica (es decir, independiente del tiempo) o la toxicidad estimada a partir de ensayos de toxicidad a largo plazo en peces (por ejemplo, métodos C.47 (22), C.15 (23) y C.14 (24)).

Debe disponerse de un método analítico adecuado, con una exactitud, una precisión y una sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia en las soluciones de ensayo y en el material biológico, así como de datos precisos sobre la preparación y la conservación de las muestras. Es necesario también conocer el límite de cuantificación analítica de la sustancia problema tanto en el agua como en los tejidos de los peces. Si se utiliza una sustancia problema radiomarcada, deberá ser del nivel más alto de pureza (por ejemplo, preferiblemente > 98 %) y deberá conocerse el porcentaje de radiactividad asociada con las impurezas.

VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

La variación de temperatura del agua será inferior a ± 2 °C, ya que unas desviaciones importantes pueden afectar a parámetros biológicos pertinentes para la absorción y la depuración, así como resultar agresivas para los animales;

La concentración de oxígeno disuelto no caerá por debajo del 60 % del nivel de saturación;

La concentración de la sustancia problema en los recipientes se mantendrá en la banda del ± 20 % de la media de los valores medidos durante la fase de absorción;

La concentración de la sustancia problema será inferior a su límite de solubilidad en el agua, teniendo en cuenta el efecto que puede tener el agua del ensayo sobre la solubilidad efectiva ([1]);

La mortalidad y demás efectos adversos o enfermedades tanto entre los peces testigo como entre los tratados serán inferiores al 10 % al final del ensayo; cuando el ensayo se prolongue a lo largo de varias semanas o meses, la mortalidad y los otros efectos adversos en los dos conjuntos de peces deberán ser inferiores al 5 % al mes y no exceder del 30 % en total; unas diferencias significativas en el crecimiento medio entre los grupos tratado y testigo de las muestras de peces podrían ser indicio de un efecto tóxico de la sustancia problema.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

El uso de sustancias de referencia de metabolismo bajo y de potencial de bioconcentración conocido podrá ayudar al control del procedimiento experimental, en caso necesario (por ejemplo, cuando un laboratorio no tenga experiencia previa con el ensayo o se hayan modificado las condiciones experimentales).

([1]) Para las sustancias de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas, debe considerarse la hidrosolubilidad de cada uno de los componentes pertinentes para determinar las concentraciones de exposición adecuadas.

▼M7

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

Se han de evitar los materiales que puedan presentar fenómenos de disolución, sorción o lixiviación o tener algún efecto adverso sobre los peces, y esto en todas las partes del equipo. Pueden utilizarse recipientes normales rectangulares o cilíndricos, hechos de material químicamente inerte y de una capacidad adaptada a la tasa de carga (véase el punto 43). Se debe reducir al mínimo el uso de tubos de plástico blando. Deben utilizarse tubos de politetrafluoroetileno, acero inoxidable o vidrio. La experiencia pone de manifiesto que pudiera ser necesario el vidrio silanizado para las sustancias que presentan un fuerte coeficiente de adsorción, como los piretroides sintéticos por ejemplo. Será necesario, en tales casos, deshacerse de los equipos una vez usados. Es preferible exponer los sistemas de ensayo a las concentraciones de la sustancia problema que se vayan a utilizar en el estudio, durante el tiempo que se requiera para demostrar el mantenimiento de unas concentraciones de exposición estables, antes de introducir los organismos de ensayo.

**Agua**

Se utiliza generalmente para el ensayo agua natural procedente de una fuente no contaminada y de calidad uniforme. Sin embargo, puede ser más adecuado utilizar agua reconstituida (es decir, agua desmineralizada con nutrientes específicos añadidos en cantidades conocidas) para garantizar la uniformidad de la calidad a lo largo del tiempo. El agua de dilución, que es el agua que se mezcla con la sustancia problema antes de introducirla en el recipiente de ensayo (véase el punto 30), debe ser tal que permita la supervivencia de la especie de peces elegida, durante los periodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan ningún comportamiento ni aspecto anormales. Idealmente, se debería demostrar que las especies sometidas al ensayo pueden sobrevivir, crecer y reproducirse en el agua de dilución (por ejemplo, mediante cría en laboratorio o un estudio de toxicidad sobre el ciclo biológico). El agua de dilución se caracterizará al menos mediante su pH, dureza, materia sólida total, carbono orgánico total (COT ()) pero también, preferentemente, mediante su contenido en amoniaco y nitritos y su alcalinidad, así como, en el caso de las especies marinas, su salinidad. No se conocen perfectamente los parámetros importantes para el bienestar óptimo de los peces, pero el apéndice 2 indica las concentraciones máximas recomendadas de una serie de parámetros relativos al agua de ensayo, tanto dulce como salada.

A lo largo de toda la duración de un ensayo, el agua de dilución debe tener calidad constante. El pH se ha de mantener entre 6,0 y 8,5 al inicio del ensayo, pero durante un ensayo dado debe permanecer dentro de un intervalo de ± 0,5 unidades de pH. Para garantizar que el agua de dilución no influye indebidamente en los resultados del estudio (por ejemplo, por complejación de la sustancia problema) ni afecta negativamente al comportamiento de las poblaciones de peces, se deben tomar regularmente muestras para análisis, al menos al inicio y al final del ensayo. Conviene proceder, por ejemplo cada tres meses si se sabe que el agua de dilución es de calidad relativamente constante, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd y Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, $Cl^{-}$, y $SO_4^{2-}$), plaguicidas (por ejemplo, plaguicidas organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua de dilución es constante al menos durante un año, las determinaciones pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada seis meses).

El contenido en partículas naturales y el carbono orgánico total del agua de dilución deben ser lo más bajos posible para evitar la adsorción de la sustancia problema a la materia orgánica, que podría reducir su biodisponibilidad y con

() El COT incluye el carbono orgánico de las partículas y el carbono orgánico disuelto, es decir, COT = COP + COD.

▼M7

ello dar lugar a una subestimación del FBC. El valor máximo admisible es de 5 mg/l para las partículas (materia seca que no atraviesa un filtro de 0,45 μm) y de 2 mg/l para el carbono orgánico total (véase el apéndice 2). En caso necesario, el agua de dilución se debe filtrar antes de usarse. La contribución al contenido en carbono orgánico del agua del ensayo que aportan los peces (excrementos) y los residuos alimentarios debe mantenerse lo más baja posible (véase el punto 46).

**Soluciones de ensayo**

Se prepara una solución madre de la sustancia problema, a una concentración adecuada. La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación de la sustancia problema en el agua de dilución. Una alternativa que puede resultar apropiada en algunos casos es la utilización de un sistema de dosificación por desorción de una fase sólida. No se recomienda en general el uso de disolventes o dispersantes (agentes solubilizantes) (véase (25)); sin embargo, la utilización de estos materiales puede ser aceptable para obtener una solución madre de concentración adecuada, pero deben hacerse todos los esfuerzos posibles para minimizar el uso de tales materiales y no debe superarse su concentración micelar crítica (si procede). Los disolventes que pueden utilizarse son la acetona, el etanol, el metanol, la dimetil-formamida y el trietilenglicol; los dispersantes que se han utilizado son el Tween 80, la metilcelulosa al 0,01 % y el HCO-40. La concentración de disolvente en el medio de ensayo final debe ser la misma en todos los tratamientos (es decir, con independencia de la concentración de la sustancia problema) y no debe ser superior a los correspondientes umbrales de toxicidad determinados para el disolvente en las condiciones del ensayo. El nivel máximo es una concentración de 100 mg/l (o 0,1 ml/l). Es poco probable que una concentración de disolvente de 100 mg/l altere de manera significativa la máxima concentración disuelta de la sustancia problema que pueda alcanzarse en el medio (25). Debe conocerse la contribución del disolvente, junto con la de la sustancia problema, al contenido global de carbono orgánico en el agua del ensayo. A lo largo del ensayo, la concentración de carbono orgánico total en los recipientes del ensayo no debe sobrepasar en más de 10 mg/l (± 20 %) la del carbono orgánico procedente de la sustancia problema y, en su caso del disolvente o agente de disolución ([1]). El contenido de materia orgánica puede afectar significativamente a la cantidad de sustancia problema disuelta libremente durante los ensayos dinámicos con peces, especialmente en el caso de sustancias muy lipófilas. La microextracción en fase sólida (véase el punto 60) puede aportar información importante sobre la relación entre los compuestos disueltos libremente y los ligados, de los que se supone que los primeros representan la fracción biodisponible. La concentración de la sustancia problema debe ser inferior a su límite de solubilidad en los medios de ensayo a pesar de la utilización de un disolvente o agente solubilizante. Deben tomarse precauciones en caso de utilización de disolventes fácilmente biodegradables, ya que estos pueden causar problemas de crecimiento bacteriano en los ensayos dinámicos. Si no es posible preparar una solución madre sin el uso de un agente solubilizante, debe prestarse atención a la adecuación de un estudio de exposición acuática frente a un estudio de exposición alimentaria.

Para los ensayos dinámicos se necesitará un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre de la sustancia problema (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional, sistema saturador) o un sistema de dosificación por desorción de una fase sólida, para conseguir las concentraciones requeridas en los recipientes de ensayo. Es preferible permitir al menos cinco renovaciones del volumen al día en cada recipiente de ensayo. Se preferirá el método dinámico, pero en caso de imposibilidad (por ejemplo, cuando los organismos del ensayo sufran efectos adversos) podrá aplicarse una técnica semiestática si siguen cumpliéndose los criterios de validez (véase el punto 24). Los caudales de las soluciones madre y del agua de dilución se controlarán 48 horas antes del ensayo y luego al menos diariamente durante este. Dicho control incluirá la determinación del caudal en cada recipiente de ensayo y garantizará que no varía en más del 20 % dentro de cada recipiente ni entre recipientes distintos.

([1]) Aunque no se recomienda en general, si se utiliza un disolvente o un agente solubilizante, el carbono orgánico procedente de este agente debe añadirse al carbono orgánico procedente de la sustancia problema para evaluar la concentración de carbono orgánico en los recipientes de ensayo.

▼M7

**Selección de las especies**

Entre los criterios importantes de selección de las especies figuran el que sean de fácil disponibilidad, que puedan obtenerse de los tamaños adecuados y que puedan mantenerse satisfactoriamente en el laboratorio. Otros criterios de selección de las especies de peces son su importancia recreativa, comercial o ecológica, así como una sensibilidad comparable, haber producido buenos resultados anteriormente, etc. Las especies de ensayo recomendadas figuran en el apéndice 3. Pueden utilizarse otras especies, pero es posible entonces tener que adaptar el procedimiento de ensayo para obtener condiciones experimentales convenientes. En tal caso, deben justificarse la elección de la especie y el método experimental. En general, la utilización de especies de peces más pequeños acorta el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio, pero puede ser necesario un número superior de peces (muestras) para analizar adecuadamente el contenido lipídico y las concentraciones de la sustancia problema en los peces. Además, es posible que las diferencias en la tasa de respiración y en el metabolismo entre los peces de más edad y los más jóvenes dificulten la comparación de resultados entre diferentes ensayos y especies de ensayo. Cabe señalar que, si los peces utilizados en un ensayo están en una fase de su ciclo vital con crecimiento rápido (juveniles), se puede complicar la interpretación de los datos.

**Preparación de los peces (pertinente para la exposición alimentaria y acuática)**

La población inicial de peces debe aclimatarse durante dos semanas al menos en agua (véase el punto 28) a la temperatura del ensayo y alimentarse con una dieta suficiente (véase el punto 45). Tanto el agua como los alimentos deben ser del mismo tipo que los usados en el ensayo.

Después de un periodo de adaptación de 48 horas, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

— Mortalidad superior al 10 % de la población en siete días: se rechaza el lote entero;

— Mortalidad entre el 5 % y el 10 % de la población en siete días: se aclimata durante otros siete días más; si en este segundo periodo de siete días la mortalidad supera el 5 %, se rechaza todo el lote;

— Mortalidad por debajo del 5 % de la población en siete días: se acepta el lote.

Los peces utilizados en los ensayos deben estar libres de enfermedades ni anomalías observables. Se deben descartar todos los peces enfermos. Los peces no deben recibir tratamiento terapéutico alguno durante el ensayo ni en las dos semanas anteriores al mismo.

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

**Ensayo preliminar**

Puede ser útil proceder a un experimento preliminar para optimizar las condiciones de realización del ensayo definitivo, como, por ejemplo, la concentración o concentraciones de la sustancia problema, o la duración de las fases de absorción y de depuración, o para determinar si es necesario llevar a cabo un ensayo completo. El diseño del ensayo preliminar debe ser tal que se obtenga la información requerida. Se puede considerar si un ensayo minimizado puede ser suficiente para obtener un FBC, o si es necesario un estudio completo (véanse los puntos 83-95 sobre el ensayo minimizado).

**Condiciones de exposición**

*Duración de la fase de absorción*

Es posible obtener una previsión de la duración de la fase de absorción a partir de la experiencia práctica (por ejemplo, a partir de un estudio previo o de un estudio de acumulación de una sustancia estructuralmente relacionada) o a partir de ciertas relaciones empíricas utilizando el dato de la hidrosolubilidad o del coeficiente de reparto octanol/agua de la sustancia problema (siempre que la absorción siga una cinética de primer orden, véase el apéndice 5).

▼M7

La fase de absorción durará 28 días salvo si puede demostrarse que se alcanza antes el estado de equilibrio (véase el apéndice 1, Definiciones y unidades). Se alcanza el estado de equilibrio en la representación gráfica de la concentración de la sustancia problema en los peces ($C_f$) en función del tiempo cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos de $C_f$ realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días presentan una diferencia máxima del ± 20 % entre sí, y no hay ningún aumento significativo de $C_f$ entre el primero y el último de los análisis sucesivos. Cuando se analizan muestras puestas conjuntamente, es necesario proceder al menos a cuatro análisis sucesivos. Si las sustancias problema se absorben con lentitud, se optará preferiblemente por intervalos semanales. Si no se ha alcanzado el estado de equilibrio en 28 días, el FBC se calcula utilizando únicamente el enfoque cinético, que no depende de que se alcance el estado de equilibrio, o bien puede ampliarse la fase de absorción, con la realización de más mediciones, hasta alcanzar el estado de equilibrio, o durante 60 días, si esto supone un plazo menor. Asimismo, es necesario que la concentración de la sustancia problema en los peces al final de la fase de absorción sea lo bastante alta como para permitir una estimación fiable de $k_2$ de la fase de depuración. Si no se consigue una absorción significativa al cabo de 28 días, el ensayo puede detenerse.

*Duración de la fase de depuración*

En el caso de las sustancias que siguen una cinética de primer orden, generalmente es suficiente la mitad de la duración de la fase de absorción para conseguir una reducción conveniente (por ejemplo, del 95 %) de la carga corporal de la sustancia (véanse en el apéndice 5 las explicaciones sobre el cálculo). Si el tiempo necesario para llegar a una pérdida del 95 % es excesivamente largo, sobrepasando por ejemplo dos veces la duración normal de la fase de absorción (es decir, más de 56 días), se podrá utilizar un periodo más corto (p. ej., hasta que la concentración de la sustancia problema sea inferior al 10 % de la concentración en el estado de equilibrio). No obstante, puede ser necesario un periodo de depuración más largo con las sustancias que presentan patrones de absorción y depuración más complejos, que no se ajustan al modelo de peces con un único compartimento, el cual corresponde a una cinética de primer orden. Si se observan o se esperan tales patrones complejos, se recomienda solicitar consejo a un bioestadístico o a un técnico de farmacocinética para garantizar una adecuada configuración del ensayo. Según se amplía el periodo de depuración, el número de peces que ha de muestrearse puede llegar a ser limitante y las diferencias de crecimiento entre los peces pueden influir en los resultados. El periodo será función también del tiempo durante el cual la concentración de la sustancia problema en los peces permanezca por encima del límite analítico de cuantificación.

*Número de peces del ensayo*

El número de peces por concentración del ensayo debe elegirse de modo que se disponga de, como mínimo, cuatro peces por cada punto de muestreo. Solo se deben poner en común los peces si no es factible el análisis de uno solo. Si es preciso conseguir una mayor precisión en el ajuste de la curva (y parámetros derivados) o si se requieren estudios del metabolismo (por ejemplo, para distinguir entre los metabolitos y la sustancia original cuando se utilizan sustancias problema radiomarcadas), será necesario disponer de más peces por punto de muestreo. El contenido lipídico debe determinarse con los mismos materiales biológicos que se utilicen para determinar la concentración de la sustancia problema. Si ello no es posible, podrá ser necesario disponer de más peces (véanse los puntos 56 y 57).

Si se utilizan peces adultos (es decir, sexualmente maduros), no deben estar en fase de desove ni haberla pasado recientemente (es decir, haber desovado ya) ni antes del ensayo ni durante el mismo. También debe indicarse si en el experimento se utilizan machos o hembras, o los dos sexos. En este último caso, será necesario comprobar (antes del inicio de la exposición) que no hay diferencias significativas de crecimiento y de contenido lipídico entre sexos, en particular si se prevé que va a ser necesario poner en común peces machos y hembras para garantizar que puedan detectarse las concentraciones de la sustancia o el contenido lipídico.

▼M7

En cada uno de los ensayos se elegirán peces de peso similar, de modo que el peso del más pequeño no sea inferior a dos tercios del peso del mayor. Pertenecerán a la misma clase de edad y procederán de la misma fuente. Ya que el peso y la edad de un pez pueden tener efectos notables sobre los valores del FBC (12), estos datos se registrarán con exactitud. Se recomienda pesar poco antes del inicio del ensayo una submuestra de la población de peces para calcular el peso medio (véase el punto 61).

*Carga*

Se debe utilizar una relación elevada agua/peces con el fin de minimizar la reducción de la concentración de la sustancia problema en el agua debida a la introducción de los peces al principio del ensayo, y también para evitar el descenso de la concentración de oxígeno disuelto. Es importante que la tasa de carga sea adaptada a la especie utilizada para el ensayo. De todos modos, se recomienda normalmente una tasa de carga peces / agua de 0,1-1,0 g de peces (peso húmedo) por litro de agua al día. Se pueden utilizar tasas de carga más elevadas si se demuestra que la concentración requerida de sustancia problema puede mantenerse en el intervalo del ± 20 %, y que la concentración de oxígeno disuelto no cae por debajo del 60 % del nivel de saturación (véase el punto 24).

Se tendrá en cuenta el hábitat normal de la especie de peces al elegir la tasa de carga adecuada. Los peces bentónicos, por ejemplo, pueden necesitar un acuario que tenga más superficie de fondo que las especies pelágicas, para un mismo volumen de agua.

*Alimentación*

Durante los periodos de aclimatación y de ensayo, se dará a los peces un alimento conveniente que tenga un contenido conocido en lípidos y proteínas totales, en cantidades suficientes para mantenerlos en buena salud y conservar el peso corporal (se permite cierto crecimiento). Se dará alimento diariamente durante los periodos de aclimatación y de ensayo a una dosis establecida en función de la especie utilizada, de las condiciones experimentales y del valor calorífico del alimento (por ejemplo, en el caso de la trucha arco iris, aproximadamente entre el 1 y el 2 % del peso corporal por día). La dosis alimentaria debe seleccionarse de forma que se evite el crecimiento rápido y el amplio aumento del contenido lipídico. Para mantener la misma dosis alimentaria, debe volver a calcularse la cantidad de alimento según proceda, por ejemplo una vez por semana. Para ese cálculo, el peso de los peces de cada recipiente de ensayo se estima a partir del peso de los peces muestreados más recientemente en ese recipiente. No hay que pesar los peces que permanecen en el recipiente.

La comida no consumida y los excrementos deben evacuarse de los recipientes de ensayo mediante sifón cada día poco después de la alimentación (de 30 minutos a una hora). Los recipientes se tendrán lo más limpios posible a lo largo del ensayo, de modo que la concentración de materia orgánica permanezca al nivel más bajo posible (véase el punto 29), puesto que la presencia de carbono orgánico puede limitar la biodisponibilidad de la sustancia problema (12).

Como muchos alimentos son derivados de harinas de pescado, debe garantizarse que el alimento no influye en los resultados del ensayo ni provoca efectos adversos, por ejemplo por contener (restos de) plaguicidas, metales pesados o la propia sustancia problema.

*Luz y temperatura*

Se recomienda un fotoperiodo de 12 a 16 horas y la temperatura (± 2°C) ha de ser adecuada para la especie utilizada (véase el apéndice 3). Deben conocerse el tipo y las características de la iluminación. Es necesario prestar atención a la posible fototransformación de la sustancia problema en las condiciones de irradiación del estudio. Se ha de utilizar una iluminación adecuada que no exponga a los peces a fotoproductos no naturales. En algunos casos, puede ser conveniente utilizar un filtro para eliminar los rayos UV por debajo de 290 nm.

▼M7

*Concentraciones de ensayo*

El ensayo se concibió inicialmente para las sustancias orgánicas apolares. Para este tipo de sustancias, se prevé que es suficiente la exposición de los peces a una única concentración, dado que no se esperan efectos de concentración, aunque pueden ser necesarias dos concentraciones en virtud del marco normativo pertinente. Si se someten a ensayo sustancias fuera de este ámbito, o se conocen otros datos, como una posible dependencia de la concentración, el ensayo deberá efectuarse con dos o más concentraciones. Si se somete a ensayo una única concentración, deberá justificarse (véase el punto 79). Además, la concentración de ensayo debe ser tan baja como sea técnica o prácticamente posible (es decir, no muy cerca del límite de solubilidad).

En algunos casos, puede anticiparse que la bioconcentración de una sustancia depende de la concentración en el agua (por ejemplo, en el caso de los metales, cuya absorción en los peces puede estar regulada al menos en parte). En tal caso, es necesario que se estudien al menos dos, pero preferiblemente más, concentraciones (véase el punto 49) que sean pertinentes desde el punto de vista medioambiental. También en el caso de las sustancias cuyas concentraciones de ensayo tienen que encontrarse cerca del límite de solubilidad por razones prácticas, se recomienda utilizar al menos dos concentraciones de ensayo, ya que esto puede dar una idea de la fiabilidad de las concentraciones de la exposición. La elección de las concentraciones de ensayo debe incorporar la concentración ambientalmente realista, así como la concentración que sea pertinente para los fines de la evaluación específica.

La concentración o concentraciones de la sustancia problema deben seleccionarse por debajo de su nivel de efecto crónico o del 1 % de su $LC_{50}$ aguda asintótica, dentro de un intervalo relevante para el medio ambiente y, como mínimo, un orden de magnitud por encima de su límite de cuantificación en el agua por el método de análisis elegido. La concentración de ensayo permisible más elevada puede establecerse también dividiendo la $LC_{50}$ aguda de 96 h por una relación aguda/crónica adecuada (p. ej., las relaciones adecuadas de algunas sustancias están alrededor de tres, pero unas cuantas están por encima de 100). Si se utiliza una segunda concentración, debe diferir de la antes citada en un factor de diez. Cuando esto no sea posible por el criterio de toxicidad (que limita la concentración de ensayo superior) y por el límite analítico (que limita la concentración de ensayo inferior), puede utilizarse un factor inferior a diez y debe considerarse el empleo de una sustancia problema radiomarcada (del nivel más alto de pureza; por ejemplo, preferiblemente > 98 %). Debe velarse por que no se utilice ninguna concentración que quede por encima del límite de solubilidad de la sustancia problema en los medios de ensayo.

*Testigos*

Además de las series de ensayo, debe estudiarse un testigo del agua de dilución o, en su caso (véanse los puntos 30 y 31), un testigo del disolvente.

**Frecuencia de la medición de la calidad del agua**

Durante el ensayo se medirán en todos los recipientes de ensayo y de testigo el oxígeno disuelto, el COT, el pH y la temperatura. En el testigo o testigos y en un recipiente de ensayo se medirán la dureza total y la salinidad (cuando proceda). Si se someten a ensayo dos o más concentraciones, estos parámetros se medirán a la concentración más elevada. Por lo menos, el oxígeno disuelto y la salinidad (cuando proceda) se medirán tres veces —al principio, hacia el medio y al final de la fase de absorción— y una vez por semana durante la fase de depuración. El COT se medirá al principio del ensayo (24 y 48 horas antes del comienzo de la fase de absorción), antes de la adición de los peces y al menos una vez por semana durante las fases de absorción y de depuración. La temperatura se medirá y registrará diariamente, el pH al principio y al final de cada periodo y la dureza una vez en cada ensayo. La temperatura se medirá preferiblemente de forma continua en un recipiente al menos.

▼M7

**Muestreo y análisis de los peces y del agua**

*Pauta de muestreo de los peces y del agua*

Se tomará agua de los recipientes de ensayo para determinar la concentración de la sustancia problema antes de la introducción de los peces y durante las fases de absorción y de depuración. Deben tomarse muestras de agua antes de añadir el alimento, al mismo tiempo que se muestrean los peces. Puede ser útil aumentar la frecuencia de muestreo para garantizar la estabilidad de las concentraciones tras la introducción de los peces. Durante la fase de absorción, deben determinarse las concentraciones de la sustancia problema a fin de comprobar el cumplimiento de los criterios de validez (punto 24). Si los análisis de las muestras de agua al inicio de la fase de depuración ponen de manifiesto que no se detecta la sustancia problema, puede utilizarse este hecho como justificación para no medir la sustancia problema en el agua de ensayo y de los testigos durante el resto de la fase de depuración.

Se deben muestrear los peces en al menos cinco ocasiones durante la fase de absorción y en al menos cuatro ocasiones durante la fase de depuración para determinar su contenido de sustancia problema. Como a veces es difícil calcular una estimación razonablemente precisa del FBC a partir de este número de muestras, en particular cuando la cinética de absorción y depuración no es la simple de primer orden, puede ser recomendable muestrear con mayor frecuencia en los dos periodos (véase el apéndice 4).

El contenido lipídico debe establecerse con los mismos materiales biológicos que se utilicen para determinar la concentración de la sustancia problema, como mínimo al inicio y al final de la fase de absorción y al final de la fase de depuración. Si ello no es posible, deben muestrearse al menos tres peces independientes para determinar su contenido lipídico en cada uno de esos tres tiempos. El número de peces por recipiente al inicio del experimento debe ajustarse en consecuencia ([1]). De forma alternativa, en caso de que no se detecten cantidades significativas de la sustancia problema en los peces testigo (es decir, peces de la población inicial), los peces testigo tomados del ensayo pueden analizarse para determinar solo el contenido lipídico, y el análisis de la sustancia problema en el grupo o grupos de ensayo (y la constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de depuración y los valores del FBC relacionados) pueden corregirse para tener en cuenta el contenido lipídico del grupo testigo durante el ensayo ([2]).

Los peces muertos o enfermos no deben analizarse en cuanto a la concentración de la sustancia problema ni la de los lípidos.

En el apéndice 4 se encuentra un ejemplo de pauta de muestreo aceptable. Pueden establecerse otras pautas fácilmente sobre la base de otros valores supuestos de $K_{OW}$ para calcular el tiempo de exposición que corresponde a una absorción del 95 % (véanse los cálculos en el apéndice 5).

Debe continuarse el muestreo durante la fase de absorción hasta que se alcance el estado de equilibrio (véase el apéndice 1, Definiciones y unidades) o se dé por terminada de otra manera la fase de absorción (después de 28 o 60 días, véanse los puntos 37 y 38). Antes de empezar la fase de depuración, los peces deben transferirse a recipientes limpios.

*Muestreo y preparación de las muestras*

Deben tomarse muestras de agua para su análisis, por ejemplo mediante sifonado a través de un tubo inerte desde un punto central del recipiente de ensayo. Ni la filtración ni la centrifugación permiten siempre separar la fracción no biodisponible de la sustancia problema respecto a su fracción biodisponible. En caso de

([1]) Si el contenido lipídico no se analiza en el mismo pez que la sustancia problema, los peces deben ser como mínimo de peso similar, y (en su caso) del mismo sexo.

([2]) Esta alternativa solo es válida si los peces en todos los grupos de ensayo se mantienen en grupos de tamaño similar, se extraen los peces según el mismo patrón y se alimentan de la misma manera. De esta forma se garantiza que el crecimiento de los peces es similar en todos los grupos de ensayo, si la concentración ensayada es inferior al intervalo tóxico. Si el crecimiento es similar, es previsible que también el contenido lipídico sea similar. Un crecimiento diferente en el testigo indicaría un efecto de la sustancia e invalidaría el estudio.

▼M7

que se aplique una técnica de separación, debe facilitarse siempre en el informe de ensayo una justificación o una validación de la técnica aplicada, dadas las dificultades de biodisponibilidad (25). Especialmente en el caso de las sustancias muy hidrófobas (es decir, sustancias con log $K_{OW}$ > 5) (12) (26), que podrían adsorberse a la matriz de filtración o a los recipientes de centrifugación, no deben someterse las muestras a estos tratamientos. En lugar de ello, se deben adoptar medidas para que los recipientes se mantengan lo más limpios posible (véase el punto 46) y debe supervisarse el contenido en carbono orgánico total a lo largo de las fases tanto de absorción como de depuración (véase el punto 53). Para evitar posibles problemas de biodisponibilidad reducida, puede recurrirse al muestreo con técnicas de microextracción en fase sólida en caso de sustancias poco solubles y muy hidrófobas.

Los peces muestreados deben sacrificarse inmediatamente, de la manera más adecuada e incruenta posible (para las mediciones de los peces enteros, no deben aplicarse más tratamientos que el lavado con agua (véase el punto 28) y el secado con un pañuelo). Se pesan y se mide la longitud total ([1]). Respecto a cada pez, deben relacionarse el peso y la longitud medidos con la concentración de la sustancia analizada (y el contenido lipídico, si procede), por ejemplo utilizando un código único de identificación para cada pez muestreado.

Es preferible analizar los peces y el agua inmediatamente después del muestreo para evitar toda degradación u otras pérdidas y para calcular aproximadamente las constantes de las velocidades de absorción y de depuración mientras continúa el ensayo. El análisis inmediato evita también retrasos en la determinación del momento en que se alcanza una meseta (estado de equilibrio).

Si no se hace el análisis inmediatamente, las muestras deben conservarse según un método conveniente. Antes del principio del estudio, debe conseguirse información sobre el método de conservación adecuado para la sustancia problema correspondiente como, por ejemplo, congelación, mantenimiento a 4 °C, extracción, etc. El periodo de almacenamiento debe seleccionarse para garantizar que la sustancia no se degrade mientras esté almacenada.

*Calidad del método analítico*

Como la totalidad del procedimiento se rige principalmente por la exactitud, la precisión y la sensibilidad del método analítico utilizado para la sustancia problema, es necesario comprobar experimentalmente que la exactitud, la precisión y la reproducibilidad del análisis de la sustancia, así como la recuperación de la sustancia problema tanto del agua como de los peces, son satisfactorias con el método particular utilizado. Esto debe formar parte de los ensayos previos. Ha de comprobarse también que la sustancia problema no es detectable en el agua de dilución utilizada. En caso necesario, se corrigen los valores de la concentración de la sustancia problema en el agua y en los peces obtenidos de los ensayos para tener en cuenta las recuperaciones y los valores de fondo de los testigos. Las muestras de peces y de agua se deben manipular en todo momento de forma que se minimicen las contaminaciones y las pérdidas (derivadas, por ejemplo, de la adsorción al equipo de muestreo).

*Análisis de las muestras de peces*

Si se utilizan para el ensayo materiales radiomarcados, se puede analizar el marcador radiactivo total (es decir, sustancia original y metabolitos) o se pueden purificar las muestras de modo que sea posible analizar separadamente la sustancia original. Si el FBC se va a basar en la sustancia original, deben caracterizarse los principales metabolitos, como mínimo al final de la fase de absorción (véase el punto 6). Los principales metabolitos serán los que representen ≥ 10 % de los residuos totales en los tejidos de los peces, los que representen ≥ 5 % en dos puntos consecutivos de muestreo, los que muestren un aumento de los niveles a lo largo de toda la fase de absorción, y los de importancia toxicológica conocida. Si el FBC para el pez entero en términos de residuos radiomarcados

([1]) Además del peso, debe registrarse la longitud total, ya que la comparación del grado de aumento de la longitud durante el ensayo es un buen indicador de si se ha producido un efecto adverso.

▼M7

totales es ≥ 500, puede ser conveniente (y, para algunas categorías de sustancias como los plaguicidas, muy recomendable), identificar y cuantificar los principales metabolitos. La cuantificación de tales metabolitos puede estar impuesta por algunas autoridades normativas. Si se identifican y cuantifican metabolitos que representan ≥ 10 % de los residuos radiomarcados totales en los tejidos de los peces, se recomienda entonces identificar y cuantificar los metabolitos también en el agua del ensayo. En caso de que esto no sea posible, deberá explicarse en el informe.

La concentración de la sustancia problema debe determinarse generalmente en cada pez pesado aparte. Si esto no es posible, se podrán poner conjuntamente las muestras de cada momento de muestreo, pero esta mezcla limita los procedimientos estadísticos que pueden aplicarse a los datos, por lo que debe incluirse en el ensayo un número adecuado de peces para conciliar la puesta en común con el procedimiento y la potencia estadísticos deseados. Las referencias (27) y (28) pueden utilizarse como introducción a los procedimientos pertinentes de puesta en común.

El FBC debe expresarse normalizado en referencia a peces con un 5 % de contenido lipídico (sobre la base del peso húmedo), además del valor derivado directamente del estudio (véase el punto 21), a menos que pueda justificarse que la sustancia problema no se acumula principalmente en los lípidos. El contenido lipídico de los peces debe determinarse si es posible en cada momento de muestreo, preferiblemente con el mismo extracto que el consagrado al análisis de la sustancia problema, puesto que a menudo los lípidos deben retirarse del extracto antes de que este se pueda analizar por cromatografía. Sin embargo, el análisis de las sustancias problema exige con frecuencia procedimientos de extracción específicos que pueden estar en contradicción con los métodos de ensayo para la determinación de los lípidos. En este caso (hasta que se disponga de métodos instrumentales adecuados no destructivos), se recomienda emplear una estrategia diferente para determinar el contenido lipídico de los peces (véase el punto 56). Deben utilizarse métodos adecuados para la determinación del contenido lipídico (20). La técnica de extracción con cloroformo/metanol (29) puede recomendarse como método normal (30), pero se recomienda como alternativa técnica el método de Smedes (31). Este último método se caracteriza por una eficiencia comparable de extracción, una alta exactitud, el uso de disolventes orgánicos menos tóxicos y la facilidad de ejecución. Pueden utilizarse, en casos debidamente justificados, otros métodos que presenten alguna ventaja en términos de exactitud respecto a los métodos recomendados. Es importante precisar bien el método utilizado.

*Medición del crecimiento de los peces*

Al comienzo del ensayo, deben pesarse por separado de cinco a diez peces de la población inicial, y debe medirse su longitud total. Puede tratarse de los mismos peces utilizados para el análisis de lípidos (véase el punto 56). El peso y la longitud de los peces utilizados para cada toma de muestras de los grupos tanto de ensayo como testigo deben medirse antes de proceder al análisis del producto o de los lípidos. Las mediciones de estos peces muestreados se pueden utilizar para estimar el peso y la longitud de los peces que quedan en los recipientes de ensayo y de testigo (véase el punto 45).

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

La curva de absorción de la sustancia problema debe obtenerse representando su concentración en los peces (interior o superficie, o tejidos específicos) durante la fase de absorción en función del tiempo, con escala aritmética. Si la curva alcanza una meseta, es decir, adopta aproximadamente una disposición asintótica respecto al eje del tiempo, se calculará del siguiente modo el FBC en el estado de equilibrio ($FBC_{SS}$):

$$\frac{C_f \text{ en el estado de equilibrio}(media)}{C_w \text{ en el estado de equilibrio}(media)}$$

▼M7

La evolución de $C_f$ puede verse influida por el crecimiento de los peces (véanse los puntos 72 y 73). La concentración de exposición media ($C_w$) se ve influida por las variaciones a lo largo del tiempo. Cabe esperar que una concentración media ponderada en función del tiempo sea más pertinente y precisa para los estudios de bioacumulación, incluso aunque la variación se encuentre en el intervalo adecuado de validez (véase el punto 24). La concentración en el agua media ponderada en función del tiempo puede calcularse de conformidad con el apéndice 5, sección 1.

El factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) debe determinarse como la relación $k_1/k_2$, que son las dos constantes de velocidad de primer orden. Las constantes de velocidad $k_1$ y $k_2$ y el $FBC_K$ pueden obtenerse ajustando simultáneamente la fase de absorción y la fase de depuración. Otra posibilidad consiste en determinar secuencialmente $k_1$ y $k_2$ (véase en el apéndice 5 una descripción y comparación de estos métodos). Es posible tener que corregir la constante de la velocidad de depuración ($k_2$) para tener en cuenta la dilución por el crecimiento (véanse los puntos 72 y 73). Si resulta evidente que la curva de absorción o de depuración no es de primer orden, entonces convendrá utilizar modelos más complejos (véanse las referencias en el apéndice 5) y buscar el consejo de un bioestadístico o de un técnico de farmacocinética.

*Datos de peso/longitud de los peces*

Los pesos húmedos y longitudes totales de cada uno de los peces en todos los intervalos de muestreo se tabulan por separado para los grupos de ensayo y testigo durante las fases de absorción (incluida la población inicial para el comienzo de la absorción) y de depuración. Respecto a cada pez, deben relacionarse el peso y la longitud medidos con la concentración del producto analizado, por ejemplo utilizando un código único de identificación para cada pez muestreado. El peso es la medida preferida del crecimiento a efectos de la corrección de los valores del FBC cinético para tener en cuenta la dilución por el crecimiento (véase, en el punto 73 y en el apéndice 5, el método utilizado para corregir los datos en función de esta dilución por el crecimiento).

*Corrección en función de la dilución por el crecimiento y normalización lipídica*

El crecimiento de los peces durante la fase de depuración puede reducir las concentraciones medidas del producto en los peces, con el resultado de que la constante de la velocidad de depuración general ($k_2$) sea mayor que la que se derivaría únicamente de los procesos de eliminación (por ejemplo, respiración, metabolismo, excreción). Los factores de bioconcentración cinéticos deben corregirse para tener en cuenta la dilución por el crecimiento. Los $FBC_{SS}$ también se verá influidos por el crecimiento, pero no se dispone de ningún procedimiento acordado para corregir los $FBC_{SS}$ en función del crecimiento. En los casos de crecimiento significativo, también deben calcularse los $FBC_K$, corregidos en función del crecimiento ($FBC_{Kg}$), ya que pueden ser una medida más pertinente del factor de bioconcentración. El contenido lipídico de los peces del ensayo (que está estrechamente relacionado con la bioacumulación de las sustancias hidrófobas) puede variar en la práctica tanto que haga necesario proceder a la normalización respecto a un contenido lipídico de los peces fijo (5 % p/p) para presentar los factores de bioconcentración, tanto el cinético como el del estado de equilibrio, de modo que tengan sentido, a menos que pueda justificarse que la sustancia problema no se acumula principalmente en los lípidos (por ejemplo, algunas sustancias perfluoradas pueden unirse a las proteínas). Las ecuaciones y ejemplos de estos cálculos figuran en el apéndice 5.

Para corregir un FBC cinético para tener en cuenta la dilución debida al crecimiento, la constante de la velocidad de depuración debe corregirse para tener en cuenta el crecimiento. Esta constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento ($k_{2g}$) se calcula restando la constante de la velocidad de crecimiento ($k_g$, obtenida directamente de los datos de pesos medidos) de la constante de la velocidad de depuración general ($k_2$). A continuación se obtiene el factor de bioconcentración cinético corregido en función del crecimiento dividiendo la constante de la velocidad de absorción ($k_1$) por la constante de la velocidad de deputación corregida según el crecimiento ($k_{2g}$) (véase el apéndice 5). En algunos casos es difícil aplicar este enfoque. Por ejemplo, en el caso de sustancias de depuración muy lenta que se estudien con peces de rápido crecimiento, la constante obtenida $k_{2g}$ puede ser muy pequeña, con lo que el error

▼M7

en las dos constantes de velocidad utilizadas para calcularla reviste una importancia crítica, y en algunos casos las estimaciones de $k_g$ pueden ser mayores que $k_2$. Un enfoque alternativo que elude la necesidad de corregir según la dilución debida al crecimiento implica la utilización de datos de depuración de masa de sustancia problema por pez (peces enteros) en lugar de los habituales datos de masa de sustancia problema por unidad de masa de peces (concentración). Esto puede conseguirse fácilmente, ya que los ensayos según el presente método deben vincular las concentraciones tisulares registradas con los pesos de cada pez. El sencillo procedimiento correspondiente se describe en el apéndice 5. Obsérvese que sigue siendo necesario comunicar el valor de $k_2$ aunque se utilice este enfoque alternativo.

Los factores de bioconcentración cinético y en estado de equilibrio deben consignarse también en relación con un contenido lipídico de los peces de referencia, del 5 % (p/p), salvo que pueda justificarse que la sustancia problema no se acumula principalmente en los lípidos. Los datos de concentración en peces, o el FBC, se normalizan con arreglo a la relación entre el 5 % y la media real (individual) del contenido lipídico (en % de peso húmedo) (véase el apéndice 5).

Si los análisis del producto y de los lípidos se realizan con un mismo pez, entonces, para calcular un FBC normalizado según el contenido lipídico, deben utilizarse los datos normalizados según el contenido lipídico de cada pez. Por otra parte, si es similar el crecimiento de los peces testigo y el de los expuestos al producto, el contenido lipídico de los peces testigo solos podrá utilizarse para la corrección según el contenido lipídico (véase el punto 56). En el apéndice 5 se describe un método de cálculo del FBC normalizado según el contenido lipídico.

**Interpretación de los resultados**

Los resultados se interpretarán con precaución cuando las concentraciones medidas de las soluciones de ensayo se encuentren a niveles cercanos al límite de detección del método de análisis.

El crecimiento medio tanto en los grupos de ensayo como en los testigos no debe ser, en principio, significativamente diferente, a fin de excluir los efectos tóxicos. Las constantes de la velocidad de crecimiento o las curvas de crecimiento de los dos grupos deben compararse siguiendo un procedimiento adecuado ([1]).

La claridad de definición de las curvas de absorción y de depuración indica la buena calidad de los datos de bioconcentración. Para las constantes de velocidad, el resultado de una prueba $\chi^2$ de la bondad del ajuste debe mostrar un buen ajuste (es decir, un pequeño porcentaje de error en la medición (32)) para el modelo de bioacumulación, de forma que las constantes de velocidad puedan considerarse fiables (véase el apéndice 5). Si se utiliza más de una concentración de ensayo, la variación de las constantes de absorción/depuración entre las concentraciones de ensayo debe ser inferior al 20 % ([2]). En caso contrario, podría indicarse la dependencia de la concentración. Se registrarán y, si es posible, se explicarán las diferencias notables que se observen en las constantes de la velocidad de absorción/depuración entre las concentraciones de ensayo aplicadas. En general, el límite de confianza del 95 % de los FBC obtenidos de estudios bien diseñados se acerca al ± 20 % del FBC derivado.

Si se someten a ensayo dos o más concentraciones, los resultados de todas las concentraciones se utilizarán para determinar si los resultados son coherentes y

([1]) Puede llevarse a cabo una prueba t de las constantes de la velocidad de crecimiento, para comprobar si el crecimiento presenta diferencias entre los grupos testigo los y de ensayo, o una prueba F en caso de análisis de la varianza. Cuando sea necesario, puede utilizarse una prueba F o prueba de la razón de verosimilitud para contribuir a la elección del modelo de crecimiento adecuado (monografía 54 de la OCDE) (32).

([2]) Estos porcentajes suponen que los métodos de análisis son fiables y que la semivida es < 14 días. Si los métodos de análisis son menos fiables o la semivida está (muy) aumentada, estas cifras serán más grandes.

▼M7

para mostrar si existe dependencia de la concentración. Si se somete a ensayo una sola concentración para reducir la utilización de animales o de recursos, debe darse la justificación correspondiente.

El $FBC_{SS}$ resultante es dudoso si el $FBC_K$ es considerablemente mayor que el $FBC_{SS}$, ya que esto puede ser un indicio de que no se ha alcanzado el estado de equilibrio o de que no se han tenido en cuenta los eventuales procesos de pérdida y de dilución por el crecimiento. En los casos en que el $FBC_{SS}$ está muy por encima del $FBC_K$, deberá comprobarse si no se han cometido errores en la obtención de las constantes de velocidad de absorción y de depuración y se evaluarán de nuevo. Un procedimiento diferente de ajuste podría mejorar la estimación de $FBC_K$ (véase el apéndice 5).

**Informe del ensayo**

Aparte de la información sobre la sustancia problema indicada en el punto 3, el informe del ensayo incluirá la información siguiente:

*Sustancia problema:*

Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas;

— Datos de identificación química, como nombre IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas según convenga y sea factible en la práctica, etc. (incluido el contenido de carbono orgánico, si procede).

— Para las sustancias de componentes múltiples y UVCB (sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos) descripción, en la medida de lo posible, de la identidad química de los componentes individuales y, para cada uno de ellos, de su porcentaje de la masa total de la sustancia. Debe resumirse cómo el método de análisis utilizado en el ensayo refleja una medida de la concentración de la sustancia; deben describirse todos los procedimientos analíticos, con inclusión de la exactitud, límite de detección y límite de cuantificación del método.

— En caso de marcado radiactivo, posición precisa del átomo o átomos marcados y porcentaje de radiactividad asociada a las impurezas.

— Información sobre la toxicidad de la sustancia problema para los peces (idealmente para la especie de ensayo). La toxicidad debe indicarse como una $LC_{50}$ aguda tras 96 horas y las concentraciones NOAEC y LOAEC a partir de un estudio crónico (es decir, un ensayo en las primeras fases de vida o un ensayo sobre el ciclo de vida completo, si está disponible).

— Las condiciones de almacenamiento de la sustancia problema o del producto problema y la estabilidad de esta sustancia o producto en las condiciones de almacenamiento, en caso de que se almacenen antes de su utilización.

*Especie de ensayo:*

Denominación científica, cepa, fuente, eventuales tratamientos previos, aclimatación, edad, sexo (si procede), rango de tamaños (peso y longitud), etc.

*Condiciones del ensayo:*

— Procedimiento de ensayo seguido (por ejemplo, dinámico o semiestático); estudio normal o diseño minimizado (incluida la justificación).

— Tipo y características de la iluminación y del fotoperiodo o fotoperiodos utilizados.

— Diseño del ensayo (por ejemplo, número y tamaño de los recipientes de ensayo, tasa de renovación del volumen de agua, tasa de carga, numero de réplicas, número de peces por réplica, número de concentraciones de ensayo, duración de las fases de absorción y depuración, frecuencia de los muestreos de peces y de agua).

▼M7

— Método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de su renovación (deben indicarse el disolvente, su concentración y su contribución al contenido de carbono orgánico del agua del ensayo, en su caso) o una descripción del sistema de dosificación alternativo.

— Las concentraciones de ensayo nominales, las medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas en los recipientes de ensayo y su método y frecuencia de obtención.

— Fuente del agua de dilución, descripción de los eventuales tratamientos previos, resultados de las posibles demostraciones de la aptitud de los peces utilizados para vivir en esta agua y características de esta: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se mide), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (en su caso) y cualquier otra medición realizada.

— Calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, dureza, COT, temperatura y concentración de oxígeno disuelto; métodos utilizados y frecuencia de las mediciones.

— Información precisa sobre la alimentación (por ejemplo, tipo de alimento o alimentos, fuente, composición —al menos contenido lipídico y en proteínas si es posible—, dosis alimentaria seleccionada, cantidad dada y frecuencia).

— Información sobre el tratamiento de las muestras de peces y de agua, incluidos datos de preparación, almacenamiento, extracción y procedimientos (con su precisión) del análisis de la sustancia problema y del contenido lipídico.

— Métodos utilizados para la aleatorización de los tratamientos y la asignación de los peces a los recipientes de ensayo.

— Fecha de introducción de los organismos de ensayo en las soluciones de ensayo y duración del ensayo.

— Descripción y resultados de los ensayos de determinación del intervalo, si se dispone de ellos.

*Resultados:*

— Resultados de los eventuales estudios preliminares efectuados.

— Mortalidad de los peces testigo y de los peces de cada recipiente de exposición y eventuales comportamientos anormales observados.

— Información sobre los eventuales efectos adversos observados.

— Descripción completa de todos los procedimientos de análisis químico empleados, incluidos los límites de detección y cuantificación, la variabilidad y la recuperación.

— Contenido lipídico de los peces, incluido el método utilizado y, si se ha obtenido, el factor de normalización según el contenido lipídico ($L_n$, factor para expresar los resultados en relación a un contenido lipídico de los peces del 5 %).

— Datos de peso (y longitud) de los peces en forma de cuadro, relacionados con la concentración del producto en cada pez (y su contenido lipídico, si procede), tanto de los grupos testigo como de los de exposición (utilizando por ejemplo un identificador únicos para cada pez muestreado), y cálculos para obtener la constante o constantes de la velocidad de crecimiento.

▼M7

— Datos tabulados de concentración de la sustancia problema en los peces ($C_f$, relacionados con cada pez) y en el agua ($C_w$) (con valores medios de los grupos de ensayo y testigo, desviación típica e intervalo, en su caso) de todos los momentos de muestreo ($C_f$ expresada en mg/kg de peso corporal húmedo entero o de tejidos específicos, p. ej. lípidos, y $C_w$ en mg/l). Valores de $C_w$ de la serie testigo (deben indicarse también los valores de fondo).

— Curvas (con todos los datos medidos) que muestren lo siguiente (si procede, las concentraciones podrán expresarse en relación con el conjunto del cuerpo y el contenido lipídico normalizado al 5 % de los animales o de tejidos específicos de estos):

  — crecimiento, es decir, peso de los peces en función del tiempo o logaritmo natural del peso en función del tiempo (incluida la constante de la velocidad de crecimiento derivada, $k_g$);

  — absorción y depuración de la sustancia problema en los peces (en un solo gráfico);

  — tiempo para alcanzar el estado de equilibrio (si se consigue);

  — logaritmo natural de la concentración frente al tiempo de absorción (incluida la constante de la velocidad de absorción obtenida, $k_1$);

  — logaritmo natural de la concentración (ln concentración) frente al tiempo de depuración (incluida la constante de la velocidad de depuración obtenida, $k_2$); y

  — curvas de las fases tanto de absorción como de depuración, que indiquen los datos y el modelo ajustado.

— Si el examen visual de una representación gráfica revela la presencia de valores anómalos evidentes, podrá aplicarse una prueba de valores anómalos, estadísticamente válida, para eliminar los puntos de datos espurios, y se aportará una justificación documentada de su omisión.

— Factor de bioconcentración en estado de equilibrio ($FBC_{SS}$), si se ha alcanzado (o casi) el estado de equilibrio.

— Factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) y constantes obtenidas de la velocidad de absorción y depuración $k_1$ y $k_2$, junto con las varianzas de $k_2$ (pendiente y ordenada en el origen) si se aplica el ajuste secuencial.

— Límites de confianza, desviación típica (si esta disponible) y métodos de cálculo/ análisis de datos de cada parámetro correspondiente a cada concentración utilizada de sustancia problema.

  — Toda información relativa a los metabolitos de la sustancia problema radiomarcada, y a su acumulación.

  — Constante o constantes de la velocidad de crecimiento (incluido el intervalo o intervalos de confianza del 95 %) y constante calculada de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento ($k_{2g}$), semivida y valores de FBC ($FBC_{Kg}$).

  — Toda observación inusual relativa al ensayo, toda divergencia respecto a estos procedimientos y toda la información pertinente restante.

  — Un cuadro recapitulativo de los datos medidos y calculados pertinentes, como se indica a continuación:

▼M7

| Constantes de la velocidad de absorción y de depuración y factores de bioconcentración (FBC) de la sustancia | |
|---|---|
| $k_g$ (constante de la velocidad de crecimiento; día$^{-1}$): | Indíquese el valor (IC 95 %) ([1]) |
| $k_1$ (constante de la velocidad de absorción general; l kg$^{-1}$ día$^{-1}$): | Indíquese el valor (IC 95 %) ([1]) |
| $k_2$ (constante de la velocidad de depuración general; día$^{-1}$): | Indíquese el valor (IC 95 %) ([1]) |
| $k_{2g}$ (constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento; día$^{-1}$): | Indíquese el valor (IC 95 %) ([1]) |
| $C_f$ (concentración del producto en los peces en el estado de equilibrio; mg kg$^{-1}$): | Indíquese el valor ± DT ([2]) |
| $C_w$ (concentración del producto en el agua; mg l$^{-1}$): | Indíquese el valor ± DT ([2]) |
| $L_n$ (factor de normalización según el contenido lipídico): | Indíquese el valor ([3]) |
| $FBC_{SS}$ (FBC en estado de equilibrio; l kg$^{-1}$) | Indíquese el valor ± DT ([2]) |
| $FBC_{SSL}$ (FBC en estado de equilibrio normalizado según el contenido lipídico; l kg$^{-1}$): | Indíquese el valor ([3]) ± DT ([2]) |
| $FBC_K$ (FBC cinético; l kg$^{-1}$) | Indíquese el valor (IC 95 %) ([1]) |
| $FBC_{Kg}$ (FBC cinético corregido según el crecimiento; l kg$^{-1}$) | Indíquese el valor (IC 95 %) ([1]) |
| $t_{1/2g}$ (semivida corregida según el crecimiento; día): | Indíquese el valor (IC 95 %) ([1]) |
| $FBC_{KL}$ (FBC cinético normalizado según el contenido lipídico; l kg$^{-1}$): | Indíquese el valor |
| $FBC_{KLG}$ (FBC cinético corregido según el crecimiento y normalizado según el contenido lipídico; l kg$^{-1}$): | Indíquese el valor |

([1]) IC: Intervalo de confianza (cuando sea posible calcularlo).
([2]) DT: Desviación típica (cuando sea posible calcularla).

Deben evitarse los resultados comunicados como «no detectados/cuantificados en el límite de detección/cuantificación» por el desarrollo preliminar del método de ensayo y el diseño experimental, puesto que tales resultados no pueden utilizarse para los cálculos de las constantes de velocidad.

## C.13 — II: **ENSAYO MINIMIZADO EN PECES CON EXPOSICIÓN ACUÁTICA**

### INTRODUCCIÓN

La creciente experiencia adquirida con la realización e interpretación del ensayo completo, tanto por los laboratorios como por los organismos normativos, pone de manifiesto que, con algunas excepciones, se aplica la cinética de primer orden para el cálculo de las constantes de las velocidades de absorción y de depuración. Así pues, con un mínimo de puntos de muestreo es posible calcular las constantes de las velocidades de absorción y de depuración, y obtener el FBC cinético.

El objetivo inicial del examen de diseños alternativos de los estudios del FBC era desarrollar un pequeño ensayo a fin de utilizarlo en una fase intermedia de

▼M7

ensayo para descartar o confirmar las estimaciones del FBC basadas en el $K_{OW}$ y en la relación QSAR, y eliminar así la necesidad de hacer un estudio completo de muchas sustancias y reducir los costes y el uso de animales a través de la reducción del muestreo y del número de secuencias analíticas efectuadas. Aun siguiendo el diseño principal del método de ensayo anterior para permitir la integración de los resultados del ensayo con los datos sobre FBC ya existentes, y para facilitar la ejecución de los ensayos y la interpretación de los datos, el objetivo era proporcionar estimaciones adecuadas del FBC, con exactitud y precisión adecuadas para poder tomar decisiones de evaluación de riesgos. Son válidas muchas de las consideraciones que se aplican también en el ensayo completo como, por ejemplo, los criterios de validez (véase el punto 24) y la detención del ensayo si se considera insignificante la absorción al final de la fase de absorción (véanse los puntos 16 y 38).

Las sustancias que podrían acogerse al diseño del ensayo minimizado deben pertenecer al ámbito general para el que se ha desarrollado este método de ensayo, es decir, el de las sustancias orgánicas apolares (véase el punto 49). Si hay alguna indicación de que la sustancia problema puede mostrar un comportamiento diferente (por ejemplo, una clara desviación respecto a la cinética de primer orden), debe llevarse a cabo un ensayo completo, a efectos de la normativa.

Por lo general, el ensayo minimizado no se realiza durante un periodo más corto que el ensayo del FBC normal, pero comprende menos muestreos de peces (véase la justificación en el apéndice 6). No obstante, se puede reducir el periodo de depuración en caso de sustancias que se depuren rápidamente, para evitar que las concentraciones en los peces caigan por debajo del límite de detección/cuantificación antes del final del ensayo. Puede utilizarse un ensayo minimizado con exposición a una única concentración para determinar la necesidad de hacer un ensayo completo, y, si los datos resultantes utilizados para calcular las constantes de velocidad y el FBC son sólidos (véase el punto 93), podrá evitarse hacer el ensayo completo si el FBC resultante está lejos de los valores preocupantes a efectos normativos.

En algunos casos, puede ser ventajoso aplicar el diseño del ensayo minimizado con más de una concentración de ensayo como ensayo preliminar para determinar si las estimaciones del FBC de una sustancia dependen de la concentración. Si las estimaciones del FBC a partir del ensayo minimizado indican dependencia de la concentración, será necesario ejecutar el ensayo completo. Si, a la vista de dicho ensayo minimizado, las estimaciones del FBC no dependen de la concentración pero los resultados no se consideran definitivos, cualquier ensayo completo que se realice posteriormente podrá limitarse a una única concentración, reduciendo así el uso de animales en comparación con un ensayo completo, con dos (o más) concentraciones de ensayo.

Para poder acogerse al ensayo minimizado, las sustancias deben:

— tener probalidades de exhibir una cinética de absorción y de depuración aproximadamente de primer orden, por ejemplo según datos derivados de la extrapolación de sustancias similares;

— tener un log $K_{OW} < 6$ a menos que se espere un metabolismo rápido ([1]);

— ser suficientemente hidrosolubles, en relación con la técnica analítica (véase el punto 24);

— ser claramente cuantificables (es decir, las concentraciones deben estar al menos un orden de magnitud por encima del límite de cuantificación), tanto en los peces como en el agua; se recomienda el marcado radiactivo (punto 23); y

— tener un periodo de depuración más largo que su semivida prevista (véanse los cálculos en el apéndice 5), o la duración de la depuración debe adaptarse en consecuencia (véase el punto 91). Se permite una excepción a esta norma si se espera que la sustancia tenga un metabolismo rápido.

([1]) El ensayo minimizado puede utilizarse de hecho para demostrar que el metabolismo es rápido cuando se sabe que esto es probable.

▼M7

PAUTA DE MUESTREO PARA ESTUDIOS SEGÚN EL DISEÑO MINIMIZADO

**Muestreo de peces**

El muestreo de peces se reduce a cuatro puntos de muestreo:

— A mediados y al final de la fase de absorción (siendo este último también el comienzo de la depuración), p. ej. a los 14 y 28 días (33).

— A mediados de la fase de depuración y a la conclusión del estudio (si la concentración de la sustancia es < 10 % de la concentración máxima, o al menos ha pasado claramente una semivida de la sustancia), p. ej. a los 7 y 14 días de depuración (33). Si se espera o se observa que la depuración sea rápida, puede ser necesario acortar el periodo de depuración para evitar que las concentraciones en los peces caigan por debajo del límite de cuantificación.

— Medición de los lípidos como en el estudio completo.

— Corrección según el crecimiento como en el estudio completo.

— El FBC se calcula como FBC cinético.

**Muestreo de agua**

Para el diseño minimizado, el agua se muestrea como en el estudio completo (véase el punto 54) o, al menos, cinco veces repartidas equitativamente a lo largo de la fase de absorción, y una vez por semana en la fase de depuración.

**Modificaciones del diseño**

Teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia problema, las previsiones válidas deducidas de la QSAR y el objetivo específico del estudio, puede considerarse la oportunidad de introducir algunas modificaciones en el diseño del estudio:

— Si resulta necesaria mayor precisión, pueden utilizarse más peces (6 u 8 en lugar de 4) para la muestra al final de la fase de absorción.

— Inclusión de un grupo de peces «extra» para utilizarlos si la depuración a los 14 días (o al final previsto de la fase de depuración) no ha sido suficiente para lograr una depuración adecuada (es decir, > 50 %). En caso de que la duración prevista de la fase de depuración sea inferior o superior a 14 días, debe adaptarse la pauta de muestreo (es decir, un grupo de peces al final previsto de la fase de depuración, y un grupo a la mitad de ese tiempo).

— Utilización de dos concentraciones de ensayo para estudiar la posible dependencia de la concentración. Si los resultados del ensayo minimizado, realizado con dos concentraciones de ensayo, muestran que el FBC no depende de la concentración (es decir, la diferencia es inferior al 20 %), puede considerarse suficiente una sola concentración de ensayo en un ensayo completo, si se lleva a cabo este.

— Parece probable que puedan utilizarse modelos de procesos de bioacumulación como los propuestos por Arnot *et al.* (35) para ayudar a planificar la longitud de las fases de absorción y depuración (véase también el apéndice 5).

**Cálculos**

La justificación de este enfoque consiste en que el factor de bioconcentración puede determinarse en un ensayo completo bien como factor de bioconcentración en estado de equilibrio ($FBC_{SS}$) calculando la relación entre la concentración de la sustancia problema en los tejidos del pez y la concentración de la sustancia problema en el agua, o bien calculando el factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) como la relación entre la constante de la velocidad de absorción $k_1$ y la constante de la velocidad de depuración $k_2$. El $FBC_K$ es válido incluso si no se consigue ninguna concentración en estado de equilibrio de la sustancia durante la absorción, siempre que los procesos de absorción y de depuración sigan aproximadamente una cinética de primer orden. Como mínimo absoluto, para calcular las constantes de las velocidades de absorción y de depuración se necesitan dos

▼M7

puntos de datos, uno al final de la fase de absorción (es decir, al inicio de la fase de depuración) y otro al final (o cuando haya pasado una parte significativa) de la fase de depuración. Se recomienda el punto de muestreo intermedio para comprobar la cinética de la absorción y de la depuración ([1]). Para los cálculos, véanse los apéndices 5 y 6.

**Interpretación de los resultados**

Para apreciar la validez y el valor informativo del ensayo, hay que verificar que el periodo de depuración supera a la semivida. Asimismo, el $FBC_{Km}$ (FBC cinético obtenido en un ensayo minimizado) debe compararse con el valor del $FBC_{SS}$ minimizado (que es el $FBC_{SS}$ calculado al final de la fase de absorción, suponiendo que se ha alcanzado el estado de equilibrio. Esto solo puede suponerse, ya que el número de puntos de muestreo no es suficiente para demostrarlo). Si el $FBC_{Km} < FBC_{SS}$ minimizado, debería darse preferencia al valor del $FBC_{SS}$ minimizado. Si el $FBC_{Km}$ es inferior al 70 % del $FBC_{SS}$ minimizado, los resultados no son válidos, y debe llevarse a cabo un ensayo completo.

Si el ensayo minimizado proporciona un $FBC_{Km}$ en la región de algún valor preocupante a efectos normativos, debe llevarse a cabo un ensayo completo. Si el resultado está lejos de cualquier valor preocupante a efectos normativos (muy por encima o muy por debajo), puede no ser necesario realizar un ensayo completo, o puede realizarse un ensayo completo con una sola concentración si así lo exige el marco normativo pertinente.

Si se ve que es necesario efectuar un ensayo completo después de un ensayo minimizado con una sola concentración, puede hacerse a una segunda concentración. Si los resultados son coherentes, se puede renunciar a efectuar un nuevo ensayo completo a una concentración diferente, ya que no se espera que la bioconcentración de la sustancia dependa de la concentración. En caso de que se haya llevado a cabo el ensayo minimizado con dos concentraciones, y los resultados muestren que no hay dependencia de la concentración, podrá realizarse el ensayo completo con una única concentración (punto 87).

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo correspondiente al ensayo minimizado debe incluir toda la información solicitada para el ensayo completo (punto 81), con la excepción de lo que no sea posible elaborar (es decir, una curva que indique el tiempo para alcanzar el estado de equilibrio y el factor de bioconcentración en el estado de equilibrio; en lugar de este último debe darse el $FBC_{SS}$ del ensayo minimizado). Además, debe incluir también la justificación de la utilización del ensayo minimizado y el $FBC_{Km}$ resultante.

## C.13 — III: ENSAYO DE BIOACUMULACIÓN EN PECES CON EXPOSICIÓN ALIMENTARIA

### INTRODUCCIÓN

El método descrito en la presente sección debe utilizarse con las sustancias a las que no sea aplicable la metodología de exposición acuática (por ejemplo, porque no puedan mantenerse concentraciones acuáticas estables y mensurables, o no puedan alcanzarse cargas corporales adecuadas en el plazo de 60 días de exposición; véanse las secciones anteriores sobre el método de la exposición acuática). Debe señalarse, sin embargo, que el criterio de valoración de este ensayo es un factor de biomagnificación (FBM) alimentario en lugar de un factor de bioconcentración (FBC) ([2]).

En mayo de 2001 se presentó en la conferencia SETAC Europe celebrada en Madrid un nuevo método para el ensayo de bioacumulación de sustancias orgánicas poco hidrosolubles (36). Este trabajo se basaba en una serie de estudios de bioacumulación notificados en la bibliografía, utilizando un método de dosificación por adición de la sustancia a los alimentos (p. ej., (37)). A principios de 2004 se sometió a un grupo de trabajo sobre sustancias PBT de la UE un proyecto de protocolo (38) diseñado para medir el potencial de bioacumulación de sustancias orgánicas poco hidrosolubles a las que no era aplicable el método de bioconcentración por exposición acuática normal, junto con un documento justificativo de referencia (39). Otra justificación aportada para este método es

([1]) Si solo se miden dos puntos de datos, las estimaciones de los límites de confianza para el $FBC_{Km}$ podrán realizarse utilizando métodos de *bootstrap*. Cuando se disponga también de puntos de datos intermedios, los límites de confianza para el $FBC_{Km}$ podrán calcularse como en el ensayo completo.

([2]) Véanse en el apéndice 1 las definiciones y unidades.

▼M7

que la exposición ambiental potencial a tales sustancias poco solubles (es decir, log $K_{OW}$ > 5) puede darse en gran parte a través de la dieta (40) (41) (42) (43) (44). Por esta razón, se hace referencia a los ensayos de exposición alimentaria en algunas normas publicadas sobre sustancias y mezclas químicas ([1]). No obstante, debe tenerse en cuenta que en el método descrito aquí la exposición a través de la fase acuosa se evita cuidadosamente, por lo que es imposible comparar directamente el valor del FBM obtenido mediante este método de ensayo con un valor del FBM obtenido a partir de un estudio de campo (en el que puede combinarse la exposición alimentaria con la acuática).

Esta sección del presente método de ensayo se basa en dicho protocolo (38) y es un nuevo método que no figuraba en la versión anterior del método C.13. Este ensayo alternativo permite investigar directamente la vía de la exposición alimentaria en condiciones de laboratorio controladas.

Los investigadores potenciales deben referirse a los puntos 1 a 14 del presente método de ensayo para conseguir información sobre cuándo puede ser preferible el ensayo de exposición alimentaria frente al ensayo de exposición acuática. Se expone información sobre las distintas consideraciones de las sustancias, la cual debe tenerse en cuenta antes de realizar el ensayo.

El uso de sustancias problema radiomarcadas puede plantearse con consideraciones similares a las relativas al método de la exposición acuática (véanse los puntos 6 y 65).

El método alimentario puede utilizarse para el ensayo de más de una sustancia en un único ensayo, siempre que se cumplan determinadas condiciones; estas se explican más detalladamente en el punto 112. En aras de la simplicidad, la metodología descrita aquí se refiere a un ensayo con una sola sustancia problema.

El ensayo alimentario es similar al método de la exposición acuática en muchos aspectos, con la evidente excepción de la vía de exposición. Por lo tanto, muchos aspectos del método aquí descrito se solapan con el método de exposición acuática descrito en la sección anterior. Se hace referencia a los puntos pertinentes de la sección anterior en la medida de lo posible pero, para mantener la legibilidad y comprensión, es inevitable una cierta cantidad de repeticiones.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Pueden emplearse condiciones dinámicas o semiestáticas (véase el punto 4); se recomiendan las condiciones dinámicas para limitar la exposición potencial de la sustancia problema a través del agua como resultado de una eventual desorción de los alimentos enriquecidos o por las heces. El ensayo se divide en dos fases: absorción (alimentos enriquecidos con la sustancia problema) y depuración (alimentos puros, sin tratar) (véase el punto 16). Durante la fase de absorción, un grupo «de ensayo» de peces recibe diariamente una dieta fija de alimentos comerciales para peces de composición conocida, enriquecidos con la sustancia problema. Lo ideal es que los peces consuman todos los alimentos que se les ofrecen (véase el punto 141). A continuación, durante la fase de depuración se dan a los peces los alimentos comerciales puros, sin tratar. Como en el caso de la exposición acuática, pueden utilizarse varios grupos de ensayo con diferentes concentraciones de la sustancia problema en los alimentos en caso necesario, pero, para la mayoría de las sustancias problema orgánicas muy hidrófobas, es

([1]) A los efectos del Reglamento (CE) n.º 1907/2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH) (DO L 396 de 30.12.2006, p. 1), esta cuestión se aborda en el documento de orientación sobre los requisitos de información y sobre la valoración de la seguridad química, capítulo R.7c, R.7.10.3.1; R.7.10.4.1; y en la figura R7.10-2.

▼M7

suficiente un solo grupo de ensayo (véanse los puntos 49 y 107). Si se utilizan condiciones semiestáticas, deben trasladarse los peces a un nuevo medio o a un nuevo recipiente de ensayo al final de la fase de absorción (en caso de que el medio o aparato utilizado en la fase de absorción se haya contaminado con la sustancia problema por lixiviación). Las concentraciones de la sustancia problema en los peces se miden durante las dos fases del ensayo. Además del grupo de peces a los que se dan los alimentos enriquecidos con la sustancia problema (grupo de ensayo), se somete a las mismas condiciones un grupo testigo de peces alimentados de forma idéntica, salvo que no se añade la sustancia problema a los alimentos comerciales para peces. Este grupo testigo permite cuantificar los niveles de fondo de la sustancia problema en los peces no expuestos y sirve de comparación en cuanto a los eventuales efectos adversos relacionados con el tratamiento observados en el grupo o grupos de ensayo ([1]). También permite la comparación de las constantes de la velocidad de crecimiento entre grupos para comprobar que se consumen cantidades similares de los alimentos ofrecidos (debe considerarse también la posibilidad de que haya diferencias de palatabilidad entre los alimentos como explicación de diferencias en las constantes de la velocidad de crecimiento; véase el punto 138). Es importante que durante las fases de absorción y de depuración se den a los grupos de ensayo y testigo alimentos nutricionalmente equivalentes.

En general es suficiente que la duración de la fase de absorción sea de 7 a 14 días, según la experiencia adquirida en el desarrollo del método (38) (39). Este intervalo debe reducir al mínimo el coste de llevar a cabo el ensayo, con una exposición suficiente para la mayoría de las sustancias. No obstante, en algunos casos puede ampliarse la fase de absorción (punto 127). Durante la fase de absorción, la concentración de la sustancia en los peces puede no alcanzar el estado de equilibrio, por lo que el tratamiento de datos y los resultados de este método se basan generalmente en un análisis cinético de los residuos tisulares (Nota: Pueden aplicarse aquí ecuaciones para calcular el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio, como en el ensayo de exposición acuática; véase el apéndice 5). La fase de depuración comienza cuando se dan a los peces por primera vez alimentos sin enriquecer con la sustancia problema, y normalmente dura hasta 28 días o hasta que la sustancia problema deja de poder cuantificarse en el pez entero, si esta fecha es anterior. La fase de depuración puede reducirse o prolongarse más allá de 28 días, dependiendo de la evolución temporal de las concentraciones medidas del producto y de la talla de los peces.

Este método permite la determinación de la semivida específica de la sustancia ($t_{1/2}$, a partir de la constante de la velocidad de depuración, $k_2$), la eficiencia de la asimilación (absorción intestinal; $a$), el factor de biomagnificación alimentario cinético ($FBM_K$), el factor de biomagnificación alimentario cinético corregido según el crecimiento ($FBM_{Kg}$), y el factor de biomagnificación alimentario cinético corregido según el contenido lipídico ([2]) ($FBM_{KL}$) (y/o el factor de biomagnificación alimentario cinético corregido según el crecimiento y el contenido lipídico, $FBM_{KgL}$) correspondientes a la sustancia problema en los peces. Como con el método de exposición acuática, el aumento de la masa de los peces durante el ensayo se traducirá en una disminución de la concentración de la sustancia problema en los peces en crecimiento y, por tanto, el FBM (cinético) estará subestimado si no se corrige para tener en cuenta este fenómeno (véanse los puntos 162 y 163). Además, si se considera que se ha alcanzado el estado de equilibrio durante la fase de absorción, puede calcularse a título indicativo un FBM en estado de equilibrio. Hay enfoques disponibles que permiten calcular un factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) a partir de los datos obtenidos en el estudio alimentario (p. ej., (44) (45) (46) (47) (48)). En el apéndice 8 se debaten las ventajas e inconvenientes de estos enfoques.

([1]) Con la mayoría de las sustancias problema, no debería detectarse nada en el agua del testigo. Las concentraciones de fondo deben ser pertinentes solo en el caso de los materiales naturales (por ejemplo, algunos metales) y de las sustancias que son ubicuas en el medio ambiente.

([2]) Dado que el FBM se define como la relación de la concentración de una sustancia en un organismo frente a la presente en el alimento del organismo en estado de equilibrio, se tienen en cuenta los lípidos mediante la corrección según el contenido lipídico en el organismo y en el alimento, por lo que se describe con mayor exactitud como «corrección». Este enfoque difiere de la «normalización» respecto a un determinado contenido lipídico de un organismo, como se hace en el ensayo de bioconcentración de exposición acuática.

▼M7

El ensayo ha sido diseñado principalmente para sustancias orgánicas apolares poco solubles que siguen aproximadamente una cinética de primer orden en los procesos de absorción y depuración en los peces. En caso de que se someta a ensayo una sustancia que no siga aproximadamente una cinética de absorción y de depuración de primer orden, convendrá utilizar modelos más complejos (véanse las referencias en el apéndice 5) y buscar el consejo de un bioestadístico o de un técnico de farmacocinética.

El FBM se determina normalmente mediante el análisis de la sustancia problema en el pez entero (en peso húmedo). Cuando sea pertinente para los objetivos del estudio, pueden muestrearse tejidos específicos (por ejemplo, músculos, hígado) si los peces se dividen en partes comestibles y no comestibles (véase el punto 21). Por otra parte, puede recurrirse a la retirada y al análisis aparte del tubo digestivo para determinar su contribución a las concentraciones en los peces enteros en los puntos de muestreo al final de la fase de absorción y cerca del comienzo de la fase de depuración, o como parte de un enfoque de balance de masas.

Debe medirse el contenido lipídico de los peces enteros muestreados, de manera que las concentraciones puedan corregirse en función del contenido lipídico, teniendo en cuenta el contenido lipídico tanto de los peces como de los alimentos (véanse los puntos 56 y 57 y el apéndice 7).

Debe medirse y registrarse el peso de los distintos peces muestreados, y relacionarse con la concentración del producto analizado en el pez correspondiente (por ejemplo, indicarse de acuerdo con un código único de identificación para cada pez muestreado), a efectos del cálculo del crecimiento que pueda producirse durante el ensayo. También debe medirse cuando sea posible la longitud total de los peces ([1]). Los datos de peso son también necesarios para la estimación del FBC a partir de los datos de depuración del ensayo alimentario.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Debe disponerse de la información sobre la sustancia problema que se describe en los puntos 3 y 22. No es generalmente necesario disponer de un método de análisis para las concentraciones de la sustancia problema en el agua; sí se necesitan métodos con la sensibilidad adecuada para medir las concentraciones en los alimentos para peces y en los tejidos de los peces.

El método puede utilizarse para el ensayo de más de una sustancia en un único ensayo. No obstante, las sustancias problema deben ser compatibles entre sí, de manera que no interactúen ni cambien su identidad química tras añadirse a los alimentos para peces. El objetivo es que los resultados medidos para cada sustancia ensayada conjuntamente no difieran considerablemente de los resultados que se obtendrían si se hicieran ensayos aparte con cada una de las sustancias problema. Mediante unos trabajos de análisis preliminares debe establecerse que cada sustancia puede recuperarse de una muestra de alimentos a los que se han añadido varias sustancias y de una muestra de tejidos de peces con: i) recuperaciones elevadas (por ejemplo, > 85 % del contenido nominal) y ii) la sensibilidad necesaria para el ensayo. La dosis total de las sustancias sometidas a ensayo conjunto debe estar por debajo de la concentración combinada que pueda causar efectos tóxicos (véase el punto 51). Por otra parte, deben tomarse en consideración en el diseño experimental los posibles efectos adversos en los peces y el potencial de efectos interactivos (por ejemplo, efectos metabólicos) asociados al ensayo simultáneo de varias sustancias. Debe evitarse el ensayo simultáneo de sustancias ionizables. En términos de exposición, el método es también adecuado para mezclas complejas (véase el punto 13, aunque se aplicarán las mismas limitaciones analíticas que en cualquier otro método).

VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes (véase el punto 24):

— La variación de la temperatura del agua es inferior a ± 2 °C en los grupos de tratamiento y de testigo.

([1]) Debe registrarse asimismo la longitud total durante el ensayo, ya que es un buen indicador de si se ha producido algún efecto adverso.

▼M7

— La concentración de oxígeno disuelto no cae por debajo del 60 % del nivel de saturación de aire.

— La concentración de la sustancia problema en los alimentos para peces antes y al final de la fase de absorción se sitúa en un intervalo del ± 20 % (basándose, como mínimo, en tres muestras de ambos puntos temporales).

— Debe demostrarse un alto grado de homogeneidad de la sustancia en los alimentos mediante análisis preliminares de los alimentos enriquecidos; las concentraciones de la sustancia de al menos tres muestras tomadas al inicio del ensayo no deben apartarse en más del ± 15 % de la media.

— No se detecta ninguna concentración de la sustancia problema, o está presente solo a niveles típicos de trazas, en los alimentos no enriquecidos o en los tejidos de los peces testigo, a diferencia de las muestras tratadas.

— La mortalidad y otros efectos adversos o enfermedades entre los peces tanto del grupo testigo como del grupo de ensayo deben ser ≤ 10 % al final del ensayo; si el ensayo se prolonga por cualquier motivo, los efectos adversos en los dos grupos serán ≤ 5 % por mes y ≤ 30 % de manera acumulativa. Unas diferencias significativas en el crecimiento medio entre los grupos de ensayo y testigo de las muestras de peces podrían ser indicio de un efecto tóxico de la sustancia problema.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Si un laboratorio no ha realizado el ensayo antes o si se han producido cambios importantes (por ejemplo, cambio de cepa o del proveedor de los peces, especie de peces diferente, cambio importante del tamaño de los peces, alimentos para peces o método de enriquecimiento de la sustancia), se aconseja realizar un estudio de competencia técnica, utilizando una sustancia de referencia. La sustancia de referencia se utiliza fundamentalmente para determinar si la técnica del enriquecimiento alimentario es adecuada para garantizar un máximo de homogeneidad y de biodisponibilidad de las sustancias problema. Un ejemplo que se ha utilizado en el caso de las sustancias hidrófobas apolares es el hexaclorobenceno (HCB), pero debe considerarse recurrir a otras sustancias con datos fiables existentes sobre su absorción y biomagnificación, debido a las propiedades peligrosas del HCB ([1]). En caso de que se utilicen sustancias de referencia, debe recogerse en el informe de ensayo información básica sobre ellas, incluidos el nombre, la pureza, el número CAS, la estructura y datos sobre toxicidad (si se dispone de ellos), como en el caso de las sustancias problema (véanse los puntos 3 y 22).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

Deben utilizarse materiales y equipos como se describe en el método de la exposición acuática (punto 26). Debe utilizarse un sistema de ensayo dinámico o de renovación semiestática que proporcione un volumen suficiente de agua de dilución a los recipientes del ensayo. Deben registrarse los caudales.

**Agua**

Debe utilizarse agua de ensayo como se describe en el método de la exposición acuática (puntos 27-29). El medio de ensayo debe caracterizarse como se describe y su calidad debe permanecer constante durante el ensayo. El contenido natural en partículas y el carbono orgánico total deben ser lo más bajos posible (≤ 5 mg/l de partículas; ≤ 2 mg/l de carbono orgánico total) antes del inicio del ensayo. El COT debe determinarse solamente antes del ensayo en el marco de la caracterización del agua de ensayo (véase el punto 53).

([1]) El HCB figura en los anexos A y C del Convenio de Estocolmo, y en los anexos I y III del Reglamento (CE) n.º 850/2004 sobre contaminantes orgánicos persistentes (DO L 158 de 30.4.2004, p. 7).

▼M7

**Alimentación**

Se recomienda utilizar alimentos para peces disponibles en el comercio (alimentos granulados que floten o que sedimenten lentamente) que estén caracterizados al menos en cuanto a su contenido de proteínas y de grasas. El alimento debe tener un granulado de tamaño uniforme para aumentar la eficiencia de la exposición alimentaria, es decir, los peces ingerirán más alimento en lugar de ingerir los gránulos más grandes y dejar perderse los más pequeños. Los gránulos deben ser de tamaño adecuado para el tamaño de los peces al principio del ensayo (por ejemplo, pueden emplearse gránulos de 0,6-0,85 mm de diámetro para peces de entre 3 y 7 cm de longitud total, y de 0,85-1,2 mm para peces de entre 6 y 12 cm de longitud total). El tamaño de los gránulos puede ajustarse según el crecimiento de los peces al inicio de la fase de depuración. En el apéndice 7 figura un ejemplo de composición adecuada de un alimento disponible en el comercio. Se han utilizado comúnmente en el desarrollo de este método dietas de ensayo con un contenido lipídico total de entre el 15 y el 20 % (p/p). Es posible que en ciertas regiones no se disponga de alimentos para peces con tan alta concentración lipídica. En estos casos, se pueden realizar estudios con una menor concentración lipídica en el alimento y, en caso necesario, se puede ajustar la dosis alimentaria de forma adecuada para mantener la salud de los peces (sobre la base de pruebas preliminares). El contenido lipídico total de las dietas del grupo de ensayo y del grupo testigo ha de medirse y registrarse antes del inicio del ensayo y al final de la fase de absorción. En el informe del estudio deben presentarse datos analíticos, facilitados por el proveedor comercial de los alimentos, sobre el contenido de nutrientes, humedad, fibra y ceniza y, si es posible, minerales y residuos de plaguicidas (por ejemplo, contaminantes prioritarios «normales»).

Al añadir la sustancia problema al alimento, se hará todo lo posible para garantizar que todo el alimento de ensayo es homogéneo. La concentración de la sustancia problema en el alimento para el grupo de ensayo debe seleccionarse teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica analítica, la toxicidad de la sustancia problema (con su NOEC si se conoce) y los datos fisicoquímicos pertinentes. En caso de utilizarse una sustancia de referencia, esta debe incorporarse preferentemente a una concentración de alrededor del 10 % de la de la sustancia problema (o, en cualquier caso, tan baja como sea posible), en función de la sensibilidad del análisis (por ejemplo, para el hexaclorobenceno se ha considerado aceptable una concentración en el alimento de 1-100 μg/g; véase en la referencia (47) más información sobre las eficiencias de asimilación del HCB).

La sustancia problema puede añadirse al alimento para peces de varias formas según sus características físicas y su solubilidad (véase en el apéndice 7 más información sobre los métodos de enriquecimiento):

— Si la sustancia es soluble y estable en los triglicéridos, debe disolverse en una pequeña cantidad de aceite de pescado o de aceite vegetal comestible antes de mezclarse con el alimento para peces; en este caso, debe tenerse cuidado para evitar producir una ración cuyo contenido lipídico sea demasiado elevado, teniendo en cuenta el contenido lipídico natural del alimento enriquecido, añadiendo la mínima cantidad conocida de aceite necesaria para conseguir la distribución y homogeneidad de la sustancia problema en el alimento, o

— El alimento debe enriquecerse con la sustancia problema utilizando un disolvente orgánico adecuado, siempre que no se vean comprometidas la homogeneidad y la biodisponibilidad (es posible que se formen (micro)cristales de la sustancia problema en el alimento como consecuencia de la evaporación de disolvente y que no haya una manera fácil de probar que esto no ha ocurrido; véase (49)), o

— Los líquidos no viscosos deben añadirse directamente al alimento para peces, pero deben mezclarse bien para favorecer la homogeneidad y facilitar la buena asimilación. La técnica de mezclado debe garantizar la homogeneidad de los alimentos enriquecidos.

▼M7

En unos pocos casos, por ejemplo en los de las sustancias problema menos hidrófobas con mayor probabilidad de desorberse del alimento, puede ser necesario recubrir los gránulos de alimento, ya preparados, con una pequeña cantidad de aceite de maíz/pescado (véase el punto 142). En tales casos, el alimento testigo debe tratarse de la misma manera, y para la medición de los lípidos debe utilizarse el alimento preparado final.

En caso de que se utilice una sustancia de referencia, los resultados obtenidos con ella deben ser comparables a los datos de los estudios de la bibliografía efectuados en condiciones similares con una dosis alimentaria comparable (véase el punto 45), y los parámetros específicos de la sustancia de referencia deben cumplir los criterios pertinentes del punto 113 (puntos 3.º, 4.º y 5.º).

Si un aceite o disolvente sirve como vehículo para la sustancia problema, debe mezclarse una cantidad equivalente del mismo vehículo (excluida la sustancia problema) con el alimento del testigo con el fin de mantener la equivalencia con el alimento enriquecido. Es importante que, durante las fases de absorción y de depuración, se den a los grupos de ensayo y testigo alimentos nutricionalmente equivalentes.

El alimento enriquecido debe conservarse en condiciones que preserven la estabilidad de la sustancia problema en la mezcla alimentaria (por ejemplo, refrigeración) y estas condiciones deben notificarse.

**Selección de la especie de peces**

Pueden utilizarse las especies de peces señaladas para la exposición acuática (veánse el punto 32 y el apéndice 3). Antes de la publicación del presente método de ensayo se han utilizado comúnmente la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la carpa (*Cyprinus carpio*) y el pez cabeza gorda (*Pimephales promelas*) en los estudios de bioacumulación alimentaria de sustancias orgánicas. Las especies de ensayo deben tener un comportamiento alimentario que dé lugar al consumo rápido de la ración alimentaria administrada, para garantizar que se reduce al mínimo cualquier factor que influya en la concentración de la sustancia problema en el alimento (por ejemplo, la lixiviación en el agua y la posibilidad de exposición acuática). Deben utilizarse peces en el intervalo recomendado de tamaño/peso (véase el apéndice 3). Los peces no deben ser tan pequeños como para que resulte difícil hacer análisis de cada individuo. Las especies sometidas a ensayo en una etapa de su vida de rápido crecimiento pueden complicar la interpretación de los datos, y unas elevadas velocidades de crecimiento pueden influir en el cálculo de la eficiencia de la asimilación ([1]).

**Preparación de los peces**

Los criterios de aceptación de aclimatación, mortalidad y enfermedad son los mismos que los del método de exposición acuática antes de realizar el ensayo (véanse los puntos 33-35).

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

**Trabajo preliminar y ensayo de determinación del intervalo**

Es necesario proceder a un trabajo analítico preliminar para demostrar la recuperación de la sustancia a partir de los tejidos de los peces y de los alimentos enriquecidos. No siempre es necesario efectuar un ensayo de determinación del intervalo para seleccionar una concentración adecuada en el alimento. A efectos de demostrar que no se observan efectos adversos y de evaluar la palatabilidad del alimento enriquecido, la sensibilidad del método analítico para los tejidos de los peces y los alimentos, y la selección de la dosis alimentaria y los intervalos de muestreo adecuados durante la fase de depuración, etc., podrán llevarse a cabo experimentos preliminares de alimentación, pero no serán obligatorios. Podría ser útil incluir un estudio preliminar para estimar el número de peces necesarios para el muestreo durante la fase de depuración. Esto puede dar lugar a una reducción

([1]) En caso de rápido crecimiento durante la fase de absorción, la dosis alimentaria real disminuirá por debajo de la establecida al comienzo de la exposición.

▼M7

significativa del número de peces utilizados, especialmente en el caso de las sustancias problema que sean particularmente susceptibles de metabolismo.

**Condiciones de exposición**

*Duración de la fase de absorción*

Suele ser suficiente una fase de absorción de 7 a 14 días, durante la cual un grupo de peces recibe el alimento testigo y otro grupo de peces recibe el alimento enriquecido, en una ración diaria fija, dependiente de la especie estudiada y de las condiciones experimentales, por ejemplo, entre el 1 y el 2 % del peso corporal (peso húmedo) en el caso de la trucha arco iris. La dosis alimentaria debe seleccionarse de forma que se evite el crecimiento rápido y el amplio aumento del contenido lipídico. En caso necesario, podrá ampliarse la fase de absorción basándose en la experiencia práctica a partir de estudios anteriores o en el conocimiento de la absorción/depuración de la sustancia problema (o de algún análogo suyo) en los peces. El inicio del ensayo se define como el momento de la primera aportación de alimento enriquecido. Un día experimental va desde el momento de la alimentación hasta poco antes (por ejemplo, una hora) del momento del aporte siguiente de alimento. Así, el primer día experimental de la absorción empieza en el momento de la primera aportación de alimento enriquecido y termina poco antes de la segunda aportación de alimento enriquecido. En la práctica, la fase de absorción termina poco antes (por ejemplo, una hora) de la primera aportación de alimento no enriquecido, ya que los peces seguirán digiriendo el alimento enriquecido y absorbiendo la sustancia problema en ese intervalo de 24 horas. Es importante garantizar que se consigue un nivel suficientemente elevado (no tóxico) de carga corporal de la sustancia problema con respecto al método analítico, de modo que pueda medirse durante la fase de depuración una disminución de al menos un orden de magnitud. En casos especiales se puede ampliar la fase de absorción (hasta 28 días) con muestreo adicional para estudiar mejor la cinética de la absorción. Durante la fase de absorción es posible que la concentración en los peces no alcance el estado de equilibrio. Pueden aplicarse aquí, como en el ensayo de exposición acuática, ecuaciones para calcular el tiempo hasta alcanzar el estado de equilibrio, como indicación del tiempo probablemente necesario para conseguir unas concentraciones apreciables en los peces (véase el apéndice 5).

En algunos casos puede saberse que la absorción de la sustancia en los peces durante 7-14 días será insuficiente para que, con la concentración alimentaria utilizada, se alcance una concentración suficientemente elevada en los peces que permita analizar una disminución de al menos un orden de magnitud durante la depuración, bien debido a la escasa sensibilidad analítica o a la baja eficiencia de la asimilación. En tales casos puede resultar conveniente ampliar la fase inicial de alimentación a más de 14 días o, especialmente cuando se trate de sustancias altamente metabolizables, debe considerarse una concentración alimentaria superior. Sin embargo, debe tenerse cuidado para mantener la carga corporal durante la absorción por debajo de la concentración sin efecto crónica (estimada) (NOEC) en los tejidos de los peces (véase el punto 138).

*Duración de la fase de depuración*

La depuración normalmente dura hasta 28 días, a contar desde que los peces del grupo de ensayo reciben el alimento puro, sin tratar, después de la fase de absorción. La depuración comienza con la primera aportación de alimento no enriquecido, y no inmediatamente después de la última aportación de alimento enriquecido, ya que los peces siguen digiriendo el alimento y absorbiendo la sustancia problema en ese intervalo de 24 horas, como se indica en el punto 126. Por lo tanto, la primera muestra de la fase de depuración se tomará poco antes de la segunda aportación de alimento no enriquecido. Este periodo de depuración está diseñado para recoger las sustancias con semivida potencial de hasta 14 días, la cual es coherente con la de las sustancias bioacumulativas ([1]), por lo que el plazo de 28 días comprende dos semividas de dichas sustancias. En los casos de sustancias muy bioacumulativas puede ser ventajoso ampliar la fase de depuración (si así lo indican las pruebas preliminares).

([1]) En un estudio de exposición acuática, una semivida de 14 días correspondería a un FBC de aproximadamente 10 000 l/kg, utilizando peces de 1 g con una velocidad de absorción correspondiente de unos 500 l/kg/d (según la ecuación de Sijm *et al.* (46)).

▼M7

Si una sustancia se depura muy lentamente de manera que no puede determinarse en la fase de depuración una semivida exacta, la información puede seguir siendo suficiente a efectos de evaluación para indicar un nivel elevado de bioacumulación. A la inversa, si una sustancia se depura tan deprisa que no pueden obtenerse una concentración fiable a tiempo cero (concentración al final de la absorción o principio de la depuración, $C_{0,d}$) ni la $k_2$, puede hacerse una estimación prudente de $k_2$ (véase el apéndice 7).

Si los análisis de los peces a intervalos anteriores (por ejemplo, a los 7 o 14 días) muestran que la sustancia se ha depurado por debajo de los niveles de cuantificación antes de que se complete el periodo de 28 días, podrá abandonarse el muestreo posterior y darse por concluido el ensayo.

En algunos casos puede no haberse producido una absorción mensurable de la sustancia problema al final de la fase de absorción (o con la segunda muestra de depuración). Si puede demostrarse que: i) se cumplen los criterios de validez del punto 113, y ii) la falta de absorción no se debe a alguna otra deficiencia del ensayo (por ejemplo, insuficiencia de la duración de la fase de absorción, deficiencias de la técnica de enriquecimiento del alimento que reducen la biodisponibilidad, falta de sensibilidad del método analítico, falta de consumo del alimento por los peces, etc.), quizá sea posible terminar el estudio sin necesidad de volver a realizarlo con una duración mayor de la absorción. Si los trabajos preliminares han indicado que podría darse esta situación, se podrá recomendar el análisis de las heces, si es posible, para buscar en ellas la sustancia problema no digerida como parte de un enfoque de «balance de masas».

*Número de peces del ensayo*

De forma análoga a la del ensayo de exposición acuática, deben seleccionarse peces de peso y longitud similares, de forma que los peces más pequeños no tengan un peso inferior a dos tercios del peso de los mayores (véanse los puntos 40-42).

El número total de peces para el estudio debe seleccionarse en función de la pauta de muestreo (un mínimo de una muestra al final de la fase de absorción y de cuatro a seis muestras durante la fase de depuración, pero según la duración de las fases), teniendo en cuenta la sensibilidad de la técnica analítica, la concentración que pueda lograrse al final de la fase de absorción (sobre la base de datos anteriores) y la duración de la depuración (si los datos previos permiten la estimación). En cada punto de muestreo deben tomarse de cinco a diez peces, y se miden los parámetros de crecimiento (peso y longitud total) antes de proceder al análisis del producto o de los lípidos.

Debido a la variabilidad intrínseca del tamaño, de la velocidad de crecimiento y de la fisiología de los peces, y a las posibles variaciones de la cantidad de alimento aportado que consume cada pez, en cada punto de muestreo deben tomarse al menos cinco peces del grupo de ensayo y cinco del grupo testigo para determinar de manera adecuada la concentración media y su variabilidad. La variabilidad entre los peces utilizados puede contribuir más a la variabilidad incontrolada general del ensayo que la variabilidad intrínseca de los métodos analíticos empleados, lo que justifica el uso de hasta diez peces por punto de muestreo en algunos casos. Sin embargo, si al inicio de la depuración no son mensurables las concentraciones de fondo de la sustancia problema en los peces testigo, el análisis químico de solo dos o tres peces testigo en el intervalo de muestreo final puede ser suficiente siempre que siga tomándose el resto de los peces testigo en todos los puntos de muestreo para medir su peso y longitud total (de forma que se muestree el mismo número a partir de los grupos de ensayo y testigo en cuanto al crecimiento). Los peces deben almacenarse y pesarse por separado (aun cuando resulte necesario que los resultados de la muestra se combinen posteriormente), y hay que medir su longitud total.

▼M7

Para un ensayo normal con, por ejemplo, una duración de depuración de 28 días, que incluya cinco muestras de depuración, esto significa un total de 59-120 peces tomados de los grupos de ensayo y 50-110 peces de los grupos testigo, suponiendo que la técnica analítica de la sustancia permite el análisis del contenido lipídico en el mismo pez. Si el análisis de los lípidos no puede realizarse con el mismo pez que el análisis del producto, y tampoco es factible utilizar peces testigo solo para el análisis de los lípidos (véase el punto 56), serán necesarios quince peces más (tres de la población inicial al comienzo del ensayo, tres de cada uno de los grupos testigo y de ensayo al inicio de la depuración y tres de cada uno de los grupos testigo y de ensayo al final del experimento). Un ejemplo de pauta de muestreo con el número de peces figura en el apéndice 4.

*Carga*

Deben utilizarse elevadas relaciones agua/peces similares a las del método de exposición acuática (puntos 43 y 44). Aunque las tasas de carga peces/agua no tienen efecto sobre las concentraciones de exposición en este ensayo, se recomienda una tasa de carga de 0,1-1,0 g de peces (peso húmedo) por litro de agua al día, para mantener unas concentraciones de oxígeno disuelto adecuadas y reducir al mínimo la agresión para los organismos de ensayo.

*Alimento del ensayo y su aportación*

Durante el periodo de aclimatación, debe darse a los peces un alimento adecuado según lo descrito anteriormente (punto 117). Si el ensayo se efectúa en condiciones dinámicas, el flujo debe suspenderse mientras se alimentan los peces.

Durante el ensayo, el alimento para el grupo de ensayo debe atenerse al descrito anteriormente (puntos 116 a 121). Además de la consideración de factores específicos de la sustancia, de la sensibilidad analítica, de la concentración prevista en el alimento en condiciones ambientales y los niveles de toxicidad crónica / carga corporal, para la selección de la concentración objetivo en el alimento enriquecido debe tenerse en cuenta la palatabilidad del alimento (de modo que los peces no eviten comerlo). La concentración nominal de la sustancia problema en el alimento enriquecido debe documentarse en el informe. Según la experiencia, unas concentraciones en el alimento enriquecido en el margen de 1-1 000 μg/g proporcionan un intervalo de trabajo práctico para sustancias problema que no presentan un mecanismo tóxico específico. En el caso de las sustancias que actúen a través de un mecanismo inespecífico, los contenidos de residuos tisulares no deben superar los 5 μmol/g de lípidos, ya que los residuos por encima de este nivel pueden presentar efectos crónicos (19) (48) (50) ([1]). En el caso de las demás sustancias, debe velarse por que no se produzcan efectos adversos debidos a la exposición acumulada (véase el punto 127). Esto es especialmente importante si se somete a ensayo simultáneamente más de una sustancia (véase el punto 112).

La cantidad adecuada de la sustancia problema puede añadirse al alimento para peces de una de las tres maneras descritas en el punto 119 y en el apéndice 7. Los métodos y procedimientos para el enriquecimiento de los alimentos deben indicarse en el informe. A los peces testigo se les da alimento sin tratar, que contenga una cantidad equivalente de vehículo oleoso no enriquecido si este se ha utilizado en el alimento enriquecido para la fase de absorción, o que haya sido tratado con disolvente «puro» si se ha utilizado algún disolvente como vehículo para la preparación del alimento del grupo de ensayo. En los alimentos tratado y sin tratar debe determinarse por análisis, al menos por triplicado, la concentración de la sustancia problema antes del inicio y al final de la fase de absorción. Después de la exposición al alimento tratado (fase de absorción), los peces (ambos grupos) reciben el alimento sin tratar (fase de depuración).

Se alimenta a los peces con una ración fija (en función de la especie; por ejemplo, aproximadamente el 1-2 % del peso corporal húmedo por día en el caso de la trucha arco iris). La dosis alimentaria debe seleccionarse de forma

([1]) Como las concentraciones internas reales solo se pueden determinar una vez que se haya realizado el ensayo, hay que hacer una estimación de la concentración interna prevista (por ejemplo, sobre la base del FBM previsto y la concentración en el alimento; véase la ecuación A5.8 en el apéndice 5).

▼M7

que se evite el crecimiento rápido y el amplio aumento del contenido lipídico. Debe registrarse la dosis alimentaria exacta utilizada durante el experimento. La alimentación inicial debe basarse en las mediciones de peso programadas de la población inicial justo antes del comienzo del ensayo. La cantidad de alimento debe ajustarse sobre la base del peso húmedo de los peces tomados en cada punto de muestreo para tener en cuenta el crecimiento durante el experimento. Los pesos y longitudes de los peces presentes en los recipientes testigo y de ensayo pueden calcularse a partir del peso y de la longitud total de los peces utilizados en cada toma de muestras; no deben pesarse ni medirse los peces que permanecen en los recipientes testigo y de ensayo. Es importante mantener a lo largo de todo el experimento la misma dosis alimentaria fijada.

Deben observarse los peces en el momento de darles el alimento para asegurarse de que consumen visiblemente todo el alimento que se les ofrece, a fin de garantizar que se utilizan en los cálculos las tasas de ingestión correctas. Debe considerarse la realización de experimentos preliminares de alimentación o la experiencia anterior, a la hora de elegir una dosis alimentaria que garantice que se consume todo el alimento aportado una vez al día. En caso de que siempre quede alimento sin comer, puede ser recomendable repartir la dosis con una aportación extra de alimentación cada día experimental (por ejemplo, sustituir la aportación de la dosis una vez al día por la aportación de la mitad de la dosis dos veces al día). Si es necesaria, la segunda aportación debe hacerse a un momento fijado y programado de forma que pase el mayor tiempo posible antes de la toma de muestras de peces (por ejemplo, el momento de la segunda aportación se fija en la primera mitad de un día experimental).

Aunque en general los peces consumen el alimento rápidamente, es importante garantizar que la sustancia permanece adsorbida al alimento. Debe procurarse evitar la dispersión de la sustancia problema en el agua, a partir del alimento que haría que los peces quedaran expuestos a concentraciones acuáticas de la sustancia problema, además de la exposición alimentaria. Esto puede lograrse retirando todo el alimento sin comer (y las heces) de los recipientes testigo y de ensayo en el plazo de una hora tras la aportación del alimento, y preferentemente en el plazo de 30 minutos. Además, puede utilizarse un sistema en el que el agua se limpie continuamente a través de un filtro de carbón activo para absorber cualquier contaminante «disuelto». Los sistemas dinámicos pueden contribuir a eliminar rápidamente las partículas de alimento y las sustancias disueltas ([1]). En algunos casos, una ligera modificación de la técnica de preparación del alimento enriquecido puede contribuir a aliviar este problema (véase el punto 119).

*Luz y temperatura*

Como en el método de la exposición acuática (véase el punto 48), se recomienda un fotoperiodo de 12 a 16 horas y una temperatura apropiada (± 2 °C) para la especie de ensayo empleada (vease el apéndice 3). Se definirán y documentarán el tipo y las características de la iluminación.

*Testigos*

Se utilizará un grupo testigo con peces alimentados con la misma ración que el grupo de ensayo, pero sin que esté presente en el alimento la sustancia problema. Si se ha utilizado un aceite o un disolvente como vehículo para enriquecer el alimento del grupo de ensayo, el grupo testigo debe tratarse exactamente igual, pero con la ausencia de la sustancia problema, de manera que los alimentos del grupo testigo y del grupo de ensayo sean equivalentes (véanse los puntos 121 y 139).

([1]) Puede no ser totalmente evitable la presencia de la sustancia problema en el medio de ensayo como consecuencia de la excreción de los peces o la lixiviación a partir del alimento. Por lo tanto, una opción es medir la concentración de la sustancia en el agua al final de la fase de absorción, especialmente si se utiliza un sistema semiestático, para ayudar a determinar si se ha producido alguna exposición acuática.

▼M7

**Frecuencia de la medición de la calidad del agua**

Las condiciones descritas en el método de exposición acuática se aplican también en este caso, salvo que el COT deberá determinarse únicamente antes del ensayo como parte de la caracterización de agua de ensayo (véase el punto 53).

**Muestreo y análisis de los peces y del alimento**

*Análisis de las muestras de alimento*

Deben analizarse muestras de los alimentos de ensayo y testigo, al menos por triplicado, para determinar la concentración de la sustancia problema y el contenido lipídico, al menos antes del inicio y al final de la fase de absorción. Deben incluirse en el informe los métodos de análisis y los procedimientos para garantizar la homogeneidad del alimento.

Las muestras deben analizarse en cuanto a su contenido de sustancia problema siguiendo el método establecido y validado. Debe efectuarse un trabajo previo al estudio para establecer el límite de cuantificación, el porcentaje de recuperación, las interferencias y la variabilidad analítica en la matriz de la muestra prevista. En caso de que se someta a ensayo un material radiomarcado, deben tenerse en cuenta consideraciones similares a las del método de exposición acuática, sustituyendo el análisis del agua por el análisis del alimento (véase el punto 65).

*Análisis de los peces*

En cada punto de muestreo de peces, se toman 5-10 ejemplares de los grupos de ensayo y testigo (en algunos casos puede reducirse el número de peces testigo; véase el punto 134).

Los muestreos deben tener lugar al mismo tiempo cada día experimental (en relación con el momento de la aportación de alimento) y deben programarse de manera que se reduzca al mínimo la probabilidad de que queden restos de alimento en el intestino durante la fase de absorción y la primera parte de la fase de depuración, con el fin de evitar las contribuciones espurias a las concentraciones totales de la sustancia problema (es decir, los peces muestreados deben retirarse al final de un día experimental, teniendo en cuenta que el día experimental comienza en el momento de la aportación de alimento y termina en el momento de la comida siguiente, unas 24 horas después. La depuración comienza con la primera aportación de alimento sin enriquecer; véase el punto 128). Es importante la primera muestra de la fase de depuración (tomada poco antes de la segunda aportación de alimento sin enriquecer), ya que la extrapolación de esta medición a un día antes se utiliza para calcular la concentración al tiempo cero ($C_{0,d}$, concentración en los peces al final de la absorción / inicio de la depuración). Con carácter opcional, puede extraerse el tubo digestivo de los peces y analizarse por separado al final de la absorción y a los días 1 y 3 de la depuración.

En cada toma de muestras, deben retirarse peces de ambos recipientes de ensayo y tratarse de la misma forma que se describe en el método de exposición acuática (véanse los puntos 61-63).

Se miden las concentraciones de la sustancia problema en los peces enteros (peso húmedo), al menos al final de la fase de absorción y durante la fase de depuración, tanto en los grupos de ensayo como en los testigos. Durante la fase de depuración, se recomienda utilizar de cuatro a seis puntos de muestreo (por ejemplo, 1, 3, 7, 14 y 28 días). Después de 1-3 días de absorción puede incluirse, de forma opcional, un punto de muestreo adicional para estimar la eficiencia de la asimilación por los peces en la fase lineal de la absorción, todavía cerca del inicio del periodo de exposición. Hay dos desviaciones principales respecto a la pauta prevista: i) si se acude a una fase de absorción ampliada con fines de investigación de la cinética de la absorción, se dispondrán más puntos de muestreo durante la fase de absorción y así tendrán que incluirse más peces (véase el punto 126); ii) si el estudio ha concluido al final de la fase de absorción porque no ha habido absorción mensurable (véase el punto 131). Deben pesarse por separado los distintos peces muestreados (y se debe medir su longitud total) a

▼M7

fin de poder determinar las constantes de la velocidad de crecimiento. Las concentraciones de la sustancia en tejidos específicos de los peces (partes comestibles y no comestibles) también pueden medirse al final de la absorción y a tiempos seleccionados de la depuración. En caso de que se someta a ensayo un material radiomarcado, deben tenerse en cuenta consideraciones similares a las del método de exposición acuática, sustituyendo el análisis del agua por el análisis del alimento (véase el punto 65).

En cuanto a la utilización periódica de una sustancia de referencia (véase el punto 25), es preferible medir las concentraciones en el grupo de ensayo al final de la absorción y a todos los tiempos de depuración especificados para la sustancia problema (peces enteros); en el grupo testigo solo es preciso analizar las concentraciones al final de la absorción (peces enteros). En determinadas circunstancias (por ejemplo, si son incompatibles las técnicas de análisis de la sustancia problema y de la sustancia de referencia, de manera que sería necesario contar con más peces para seguir la pauta de muestreo), puede aplicarse el planteamiento siguiente para minimizar el número de peces adicionales necesarios. Las concentraciones de la sustancia de referencia se miden durante la depuración solo en los días 1, 3 y en dos puntos más de muestreo, seleccionados de forma que puedan hacerse estimaciones fiables de la concentración a tiempo cero ($C_{0,d}$) y de $k_2$ de la sustancia de referencia.

En la medida de lo posible, debe determinarse el contenido lipídico de los distintos peces en cada punto de muestreo o, como mínimo, al inicio y al final de la fase de absorción y al final de la fase de depuración (véanse los puntos 56 y 57). Dependiendo del método analítico (véanse el punto 67 y el apéndice 4), quizás sea posible usar el mismo pez para la determinación tanto del contenido lipídico como de la concentración de la sustancia problema. Esto es preferible a efectos de reducir al mínimo el número de peces. No obstante, si esto no es posible, puede utilizarse el mismo enfoque descrito en el método de exposición acuática (véase el punto 56 en relación con estas opciones alternativas de medición de los lípidos). El método utilizado para cuantificar el contenido lipídico debe documentarse en el informe.

*Calidad del método analítico*

Se deben realizar controles experimentales para garantizar la especificidad, la exactitud, la precisión y la reproducibilidad de la técnica analítica específica de la sustancia, así como la recuperación de la sustancia problema tanto del alimento como de los peces.

*Medición del crecimiento de los peces*

Al comienzo del ensayo debe pesarse una muestra de peces de la población inicial, y debe medirse su longitud total. Estos peces deben muestrearse poco antes de la primera aportación de alimento enriquecido (p. ej., una hora), y asignarse al día experimental 0. El número de peces de esta muestra debe ser al menos igual que el de las muestras durante el ensayo. Algunos de estos peces pueden ser los mismos utilizados para el análisis de lípidos antes del comienzo de la fase de absorción (véase el punto 153). En cada punto de muestreo se pesan primero los peces y se mide su longitud. Respecto a cada pez, deben relacionarse el peso y la longitud medidos con la concentración del producto analizado (y el contenido lipídico, si procede), por ejemplo utilizando un código único de identificación para cada pez muestreado. Las mediciones de estos peces muestreados se pueden utilizar para estimar el peso y la longitud de los peces que quedan en los recipientes de ensayo y de testigo.

**Evaluación experimental**

Han de realizarse diariamente observaciones de la mortalidad, que se deben registrar. Deben hacerse otras observaciones de efectos adversos, por ejemplo sobre comportamiento o pigmentación anormales, y se registrarán también. Los peces se consideran muertos si no existe ningún movimiento respiratorio y no puede detectarse ninguna reacción a un estímulo mecánico ligero. Los peces muertos o claramente moribundos deben eliminarse.

▼M7

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

Los resultados de los ensayos se utilizan para calcular la constante de la velocidad de depuración ($k_2$) en función del peso total húmedo de los peces. Se calcula la constante de la velocidad de crecimiento, $k_g$, basada en el aumento medio del peso de los peces, y se utiliza para obtener la constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento, $k_{2g}$, si procede. Además deben indicarse la eficiencia de la asimilación (a; absorción intestinal), el factor de biomagnificación cinético ($FBM_K$) (en caso necesario, corregido según el crecimiento, $BMF_{Kg}$), su valor corregido según el contenido lipídico ($FBM_{KL}$ o $BMF_{KgL}$, si se corrige según la dilución por el crecimiento) y la dosis alimentaria. Asimismo, si puede estimarse el tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio en la fase de absorción (p. ej., tiempo al 95 % del estado de equilibrio o $t_{95} = 3{,}0/k_2$), podrá incluirse una estimación del FBM en el estado de equilibrio ($FBM_{SS}$) (véanse los puntos 105 y 106, y el apéndice 5) si el valor de $t_{95}$ indica que es posible haber alcanzado las condiciones del estado de equilibrio. Debe aplicarse a este $FBM_{SS}$ la misma corrección según el contenido lipídico que al FBM derivado cinéticamente ($FBM_K$) para dar un valor corregido según el contenido lipídico, $FBM_{SSL}$ (téngase en cuenta que no se dispone de ningún procedimiento reconocido para corregir un FBM en estado de equilibrio según la dilución por el crecimiento). En el apéndice 7 se encuentran fórmulas y ejemplos de cálculos. Hay enfoques disponibles que permiten calcular un factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) a partir de los datos obtenidos en el estudio alimentario. Este aspecto se trata en el apéndice 8.

*Datos de peso/longitud de los peces*

Los pesos húmedos y las longitudes de los distintos peces correspondientes a todos los puntos temporales se tabulan por separado para los grupos de ensayo y de testigo, en todos los días de muestreo durante la fase de absorción (población inicial para el comienzo de la absorción; grupo de ensayo y grupo testigo para el final de la absorción y, en su caso, la fase primera (por ejemplo, días 1-3 de absorción) y la fase de depuración (p. ej., días 1, 2, 4, 7, 14, 28, para los grupos de ensayo y testigo). El peso es la forma más adecuada de medir el crecimiento a efectos de corrección de la dilución debida al crecimiento. Véase más adelante (puntos 162 y 163) y el apéndice 5 sobre el método o métodos utilizados para corregir los datos según la dilución por el crecimiento.

*Datos de la concentración de la sustancia problema en los peces*

Respecto a cada momento de muestreo, se recogen en cuadros las mediciones de residuos de la sustancia problema en cada pez (o en muestras conjuntas de peces si no es posible hacer la medición en cada pez), expresadas en términos de concentración en peso húmedo (p/p), tanto de los peces de ensayo como de los testigos. Si se han realizado análisis de lípidos en cada pez muestreado, pueden obtenerse y recogerse en cuadros las concentraciones individuales corregidas según el contenido lipídico, expresadas en concentración en lípidos (p/p lípidos).

— Se obtienen los logaritmos naturales de las mediciones de residuos de la sustancia problema en cada pez (o en muestras conjuntas de peces si no es posible hacer la medición en cada pez, véase el punto 66) correspondientes al periodo de depuración, y se representan gráficamente frente al tiempo (días). Si un examen visual de la representación revela la presencia de valores anómalos evidentes, podrá aplicarse una prueba de valores anómalos, estadísticamente válida, para eliminar los puntos de datos espurios, así como la justificación documentada de su omisión.

— Se calcula una correlación lineal por mínimos cuadrados para los datos de ln (concentración) frente a los días de depuración. La pendiente y la ordenada en el origen de la recta se indican como la constante de la velocidad de depuración general ($k_2$) y el logaritmo natural de la concentración derivada a tiempo cero ($C_{0,d}$) (véanse más detalles en los apéndices 5 y 7). Si ello no es posible porque las concentraciones caen por debajo del límite de cuantificación en la segunda muestra de depuración, puede hacerse una estimación prudente de $k_2$ (véase el apéndice 7).

— Las varianzas de la pendiente y de la ordenada en el origen de la recta se calculan utilizando procedimientos estadísticos normales, y se evalúan y presentan los intervalos de confianza del 90 % (o del 95 %) en torno a estos resultados.

▼M7

— También se calcula la media de la concentración medida en los peces el último día de la absorción (concentración medida al tiempo cero, $C_{0,m}$), y se compara con el valor derivado $C_{0,d}$. En caso de que el valor derivado sea inferior al valor medido, la diferencia puede sugerir la presencia de alimento enriquecido sin digerir en el intestino. Si el valor derivado es muy superior al valor medido, podría ser un indicio de que el valor derivado a partir de la regresión lineal de los datos de depuración es incorrecto y debe evaluarse de nuevo (véase el apéndice 7).

*Velocidad de depuración y factor de biomagnificación*

Para calcular el factor de biomagnificación a partir de los datos, en primer lugar debe obtenerse la eficiencia de la asimilación (absorción de la sustancia problema a través del intestino, α). Con este objetivo debe utilizarse la ecuación A7.1 del apéndice 7, para lo que han de conocerse la concentración derivada en los peces al tiempo cero de la fase de depuración ($C_{0,d}$), la constante de la velocidad de depuración (general) ($k_2$), la concentración en el alimento ($C_{food}$), la constante de velocidad de ingestión del alimento ($I$) y la duración de la fase de absorción ($t$). La pendiente y la ordenada en el origen de la relación lineal entre el ln (concentración) y el tiempo de depuración se comunican como la constante de la velocidad de depuración general ($k_2$ = pendiente) y la concentración a tiempo cero ($C_{0,d} = e^{\text{ordenada en origen}}$), como arriba. Los valores derivados deben comprobarse en cuanto a su verosimilitud biológica (por ejemplo, la eficiencia de la asimilación como fracción no es superior a 1). *(I)* se calcula dividiendo la masa de alimentos por la masa de peces alimentados cada día (si la cantidad de alimento que se les da es el 2 % del peso corporal, *(I)* será 0,02). No obstante, puede ser necesario ajustar la dosis alimentaria utilizada en el cálculo para tener en cuenta el crecimiento de los peces (esto puede hacerse utilizando la constante conocida de la velocidad de crecimiento para estimar el peso de los peces en cada punto temporal durante la fase de absorción; véase el apéndice 7). En los casos en que no pueden derivarse $k_2$ y $C_{0,d}$ debido a que, por ejemplo, las concentraciones caen por debajo del límite de detección en la segunda muestra de la fase de depuración, puede hacerse una estimación prudente de $k_2$ y establecerse un «límite superior» del $FBM_k$ (véase el apéndice 7).

Una vez obtenida la eficiencia de la asimilación ($\alpha$), puede calcularse el factor de biomagnificación multiplicando $\alpha$ por la constante de la velocidad de ingestión ($I$) y dividiendo por la constante de la velocidad de depuración (general) ($k_2$). El factor de biomagnificación corregido según el crecimiento se calcula del mismo modo pero utilizando la constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento ($k_{2g}$); véanse los puntos 162 y 163. Puede obtenerse una estimación alternativa de la eficiencia de la asimilación si se ha realizado el análisis de tejidos de los peces muestreados en la primera etapa, lineal, de la fase de absorción; véanse el punto 151 y el apéndice 7. Este valor representa una estimación independiente de la eficiencia de la asimilación en el caso de un organismo principalmente no expuesto (es decir, los peces cerca del comienzo de la fase de absorción). Para obtener el FBM se suele utilizar la eficiencia de la asimilación estimada a partir de los datos de depuración.

*Corrección según el contenido lipídico y corrección según la dilución debida al crecimiento*

El crecimiento de los peces durante la fase de depuración puede reducir las concentraciones medidas del producto en los peces, con el resultado de que la constante de la velocidad de depuración general ($k_2$) sea mayor que la que se derivaría únicamente de los procesos de eliminación (por ejemplo, metabolismo, excreción) (véase el punto 72). Los contenidos lipídicos de los peces del ensayo (que están estrechamente relacionados con la bioacumulación de sustancias hidrófobas) y los contenidos lipídicos de los alimentos pueden variar bastante en la práctica, de tal manera que su corrección es necesaria para presentar los factores de biomagnificación de manera significativa. Debe corregirse el factor de biomagnificación según la dilución debida al crecimiento (como el FBC cinético en el método de exposición acuática) y según el contenido lipídico de los alimentos con respecto al de los peces (factor de corrección por los lípidos). Las ecuaciones y ejemplos de estos cálculos figuran en el apéndice 5 y en el apéndice 7, respectivamente.

Para corregir según la dilución debida al crecimiento, debe calcularse la constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento ($k_{2g}$) (véanse las ecuaciones en el apéndice 5). Esta constante de la velocidad de depuración

▼M7

corregida según el crecimiento ($k_{2g}$) se utiliza a continuación para calcular el factor de biomagnificación corregido según el crecimiento, como en el punto 73. En algunos casos es imposible aplicar este enfoque. Un enfoque alternativo que elude la necesidad de corregir según la dilución debida al crecimiento implica la utilización de datos de depuración de masa de sustancia problema por pez (peces enteros) en lugar de los habituales datos de masa de sustancia problema por unidad de masa de peces (concentración). Esto puede conseguirse fácilmente, ya que los ensayos según el presente método deben vincular las concentraciones tisulares registradas con los pesos de cada pez. El sencillo procedimiento correspondiente se describe en el apéndice 5. Obsérvese que sigue siendo necesario estimar y comunicar el valor de $k_2$ aunque se utilice este enfoque alternativo.

Para corregir según el contenido lipídico de los peces y de los alimentos cuando no se ha realizado el análisis de los lípidos en todos los peces muestreados, se derivan las fracciones lipídicas medias (p/p) en los peces y en los alimentos ([1]). El factor de corrección según el contenido lipídico ($L_c$) se calcula entonces dividiendo la fracción lipídica media de los peces por la fracción lipídica media de los alimentos. El factor de biomagnificación, corregido según el crecimiento o no, en función del caso, se divide por el factor de corrección según el contenido lipídico para calcular el factor de biomagnificación corregido según el contenido lipídico.

Si se han llevado a cabo análisis del producto y de los lípidos con los mismos peces en cada punto de muestreo, los datos tisulares corregidos según el contenido lipídico relativos a cada pez pueden utilizarse para calcular directamente un FBM corregido según el contenido lipídico (véase (37)). La gráfica de los datos de la concentración corregidos según el contenido lipídico proporciona $C_{0,d}$ referida al contenido lipídico y $k_2$. Entonces puede procederse al análisis mtemático utilizando las mismas ecuaciones del apéndice 7, pero la eficiencia de la asimilación ($a$) se calcula utilizando la constante de la velocidad de ingestión de alimentos normalizada según el contenido lipídico ($I_{lipid}$) y la concentración alimentaria referida al contenido lipídico ($C_{food\text{-}lipid}$). Los parámetros corregidos según el contenido lipídico se utilizan a continuación de forma similar para calcular el FBM (obsérvese que la corrección de la constante de la velocidad de crecimiento debe aplicarse también a la fracción lipídica, en lugar de al peso húmedo de los peces, para calcular el $FBM_{KgL}$ corregido según el contenido lipídico y el crecimiento).

**Interpretación de los resultados**

El crecimiento medio tanto en los grupos de ensayo como en los testigos no debe ser, en principio, significativamente diferente, a fin de excluir los efectos tóxicos. Las constantes de la velocidad de crecimiento o las curvas de crecimiento de los dos grupos deben compararse siguiendo un procedimiento adecuado ([2]).

**Informe del ensayo**

Después de terminar el estudio, se preparará un informe final que contenga la información sobre la sustancia problema, la especie de ensayo y las condiciones del ensayo que figuran en el punto 81 (como en el caso del método de la exposición acuática). Además se exigirá la siguiente información:

*Sustancia problema:*

— La eventual información sobre la estabilidad de la sustancia problema en el alimento preparado;

([1]) Este enfoque es específico del estudio alimentario, distinto del procedimiento seguido en la exposición acuática, de ahí que se haya utilizado el término «corrección» en lugar de «normalización» a fin de evitar confusiones (véase también la nota a pie de página del punto 106).

([2]) Puede llevarse a cabo una prueba t de las constantes de la velocidad de crecimiento, para comprobar si el crecimiento presenta diferencias entre los grupos testigo y de ensayo, o un test F en caso de análisis de la varianza. Cuando sea necesario, puede utilizarse una prueba F o prueba de la razón de verosimilitud para contribuir a la elección del modelo de crecimiento adecuado (monografía 54 de la OCDE) (32).

▼M7

*Condiciones del ensayo:*

— La concentración nominal de la sustancia en el alimento, técnica de enriquecimiento, cantidad de vehículo (lipídico) utilizado en el proceso de enriquecimiento del alimento (en su caso), mediciones de la concentración de la sustancia problema en los alimentos enriquecidos respecto a cada análisis (al menos por triplicado antes del inicio del estudio y al final de la absorción) y valores medios;

— En su caso, tipo y calidad del aceite o disolvente vehículo (grado, proveedor, etc.) utilizado para el enriquecimiento del alimento;

— Tipo de alimento empleado (análisis proximal [1]), grado o calidad, proveedor, etc.), dosis alimentaria durante la fase de absorción, cantidad de alimento administrado y frecuencia (incluidos los posibles ajustes basados en el peso de los peces muestreados);

— Momento en que se recogen los peces y se sacrifican para el análisis químico en cada punto de muestreo (por ejemplo, una hora antes de la alimentación del siguiente día);

*Resultados:*

— Resultados de los eventuales trabajos preliminares efectuados;

— Información sobre los eventuales efectos adversos observados;

— Descripción completa de todos los procedimientos de análisis químico empleados, incluidos los límites de detección y cuantificación, la variabilidad y la recuperación;

— Las concentraciones de lípidos medidas en los alimentos (enriquecidos y testigo), individuales, medias y desviaciones típicas;

— Datos de peso (y longitud) de los peces en forma de cuadro, relativos a cada pez, tanto de los grupos testigo como de los de exposición (utilizando por ejemplo identificadores únicos para cada pez), y cálculos, constante o constantes de la velocidad de crecimiento derivadas e intervalo o intervalos de confianza del 95 %;

— Datos en forma de cuadro de la concentración de la sustancia problema en los peces, concentración medida media al final de la absorción ($C_{0,m}$), y constante de la velocidad de depuración (general) derivada ($k_2$) y concentración en los peces al inicio de la fase de depuración ($C_{0,d}$) junto con las varianzas de estos valores (pendiente y ordenada en el origen);

— Datos en forma de cuadro del contenido lipídico de los peces (enumerados junto a las concentraciones específicas de la sustancia, en su caso), valores medios por grupo de ensayo y testigo al inicio del ensayo, al final de la absorción y al final de la depuración;

— Curvas (con todos los datos medidos) que muestren lo siguiente (si procede, las concentraciones podrán expresarse en relación con el conjunto del cuerpo de los animales o de tejidos específicos de estos):

  — crecimiento (es decir, longitud (y peso) de los peces frente al tiempo) o logaritmo natural del peso frente al tiempo;

[1] Técnica de análisis de productos alimenticios para determinar el contenido de proteínas, lípidos, fibra bruta y cenizas; esta información la tiene normalmente el proveedor del alimento.

▼M7

— la depuración de la sustancia problema en los peces; y

— el logaritmo natural de la concentración (ln concentración) frente al tiempo de depuración (incluidas la constante de la velocidad de depuración derivada $k_2$, y el logaritmo natural de la concentración derivada en los peces al comienzo de la fase de depuración, $C_{0,d}$).

— Si el examen visual de una representación gráfica revela la presencia de valores anómalos evidentes, podrá aplicarse una prueba de valores anómalos, estadísticamente válida, para eliminar los puntos de datos espurios, y se aportará una justificación documentada de su omisión.

— Valores calculados de la constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento y de la semivida corregida según el crecimiento.

— Eficiencia calculada de la asimilación (α).

— FBM alimentario «bruto», FBM cinético corregido según el contenido lipídico y la dilución debida al crecimiento («bruto» y corregido según el contenido lipídico en relación al peso húmedo de los peces enteros), FBM específico de cada tejido si procede.

— Toda información relativa a los metabolitos de la sustancia problema radiomarcada, y a su acumulación.

— Toda observación inusual relativa al ensayo, toda divergencia respecto a estos procedimientos y toda la información pertinente restante.

— Un cuadro recapitulativo de los datos medidos y calculados pertinentes, como se indica a continuación:

| Constantes de la velocidad de depuración de la sustancia y factores de biomagnificación ($FBM_K$) | |
|---|---|
| $k_g$ (constante de la velocidad de crecimiento; día$^{-1}$): | Indíquese el valor (IC 95 %) (1) |
| $k_2$ (constante de la velocidad de depuración general; día$^{-1}$): | Indíquese el valor (IC 95 %) |
| $k_{2g}$ (constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento; día$^{-1}$): | Indíquese el valor (IC 95 %) (1) |
| $C_{0,m}$ (concentración medida al tiempo cero, concentración en los peces al final de la absorción) (μg/g): | Indíquese el valor ± DT (2) |
| $C_{0,d}$ (concentración derivada al tiempo cero de la fase de depuración; μg/g): | Indíquese el valor ± DT (2) |
| $I$ (velocidad nominal de ingestión de alimento; g de alimento/g de pez/día): | Indíquese el valor |
| $I_g$ (dosis alimentaria efectiva, ajustada según el crecimiento; g de alimento/g de pez/día) (2): | Indíquese el valor ± DT (2) |
| $C_{food}$ (concentración del producto en el alimento; μg/g): | Indíquese el valor ± DT (2) |
| $\alpha$ (eficiencia de la asimilación de la sustancia): | Indíquese el valor ± DT (2) |
| $FBM_K$ (FBM alimentario cinético): | Indíquese el valor (IC 95 %) (1) |
| $FBM_{Kg}$ (FBM alimentario cinético corregido según el crecimiento): | Indíquese el valor (IC 95 %) (1) |

▼M7

| Constantes de la velocidad de depuración de la sustancia y factores de biomagnificación ($FBM_K$) | |
|---|---|
| $t_{1/2g}$ (semivida corregida según el crecimiento, en días): | Indíquese el valor ± DT ([2]) |
| *L*c (factor de corrección respecto al contenido lipídico): | Indíquese el valor |
| $FBM_{KgL}$ (FBM cinético corregido según el contenido lipídico y según el crecimiento): | Indíquese el valor |
| $FBM_{SS\text{-}L}$ (FBM indicativo en el estado de equilibrio corregido según el contenido lipídico) ([2]): | Indíquese el valor ± DT ([2]) |

([1]) IC: Intervalo de confianza (cuando sea posible calcularlo).
([2]) DT: Desviación típica (cuando sea posible calcularla).

BIBLIOGRAFÍA

(1) Capítulo C.13 del presente anexo, Bioconcentración: ensayo dinámico con peces.

(2) Capítulo A.6 del presente anexo, Hidrosolubilidad.

(3) Li A, Doucette W.J. (1993), The effect of cosolutes on the aqueous solubilities and octanol/water partition coefficients of selected polychlorinated biphenyl congeners. Environ Toxicol Chem 12: 2031-2035

(4) Capítulo A.8 del presente anexo, Coeficiente de reparto *(n-octanol/agua): método del frasco de agitación.*

(5) Capítulo A.24 del presente anexo, Coeficiente de reparto *(n-octanol/agua): método de HPLC.*

(6) Capítulo A.23 del presente anexo, Coeficiente de reparto *(n-octanol/agua): método de agitación lenta.*

(7) Capítulo C.7 del presente anexo, Hidrólisis en función del *pH*.

(8) OCDE (1997), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Number 7: Guidance Document on Direct Phototransformation of Chemicals in Water OCDE/GD(97)21. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(9) Capítulo A.5 del presente anexo, Tensión superficial de soluciones acuosas.

(10) Capítulo A.4 del presente anexo, Presión de vapor.

(11) Capítulo C.4 del presente anexo, *Biodegradabilidad fácil.*

(12) Capítulo C.29 del presente anexo, *Biodegradabilidad fácil — $CO_2$ en recipientes sellados*.

(13) Connell D.W. (1988), Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102: 117-156.

(14) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(15) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

▼M7

(16) Brown R.S., Akhtar P., Åkerman J., Hampel L., Kozin I.S., Villerius L.A. and Klamer H.J.C. (2001), Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35: 4097-4102.

(17) Fernandez J.D., Denny J.S. and Tietge J.E. (1998), A simple apparatus for administering 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to commercially available pelletized fish food. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2058-2062.

(18) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N., Whiteman F.W. and Dawson T.D. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: I. Feeding studies with 2,2′, 5,5′-tetrachlorobiphenyl. Toxicol. Sci. 77: 206-218.

(19) Parkerton T.F., Arnot J.A., Weisbrod A.V., Russom C., Hoke R.A., Woodburn K., Traas T., Bonnell M., Burkhard L.P. and Lampi M.A. (2008), Guidance for evaluating *in vivo* fish bioaccumulation data. Integr. Environ. Assess. Manag. 4: 139-155.

(20) Verbruggen E.M.J., Beek M., Pijnenburg J. and Traas T.P. (2008). Ecotoxicological environmental risk limits for total petroleum hydrocarbons on the basis of internal lipid concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2436-2448.

(21) Schlechtriem C., Fliedner A. and Schäfers C. (2012), Determination of lipid content in fish samples from bioaccumulation studies: Contributions to the revision of OECD Test Guideline 305. Environmental Sciences Europe 2012, 24:13. published: 3 April 2012.

(22) Capítulo C.47 del presente anexo, Ensayo de toxicidad en las primeras fases de vida de los peces.

(23) Capítulo C.15 del presente anexo, *Ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines*.

(24) Capítulo C.14 del presente anexo, *Ensayo de crecimiento en peces juveniles*.

(25) OCDE (2000), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 23: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures ENV/JM/MONO(2000)6. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

(26) US-EPA (1994), Great Lake water quality initiative technical support document for the procedure to determine bioaccumulation factors 822-R-94-002. US EPA, Office of Water, Office of Science and Technology, Washington, DC, USA.

(27) US-FDA (1999), Pesticide analytical manual (PAM). Vol.1. US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.

(28) US-EPA (1974), Section 5, A (1) Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson, J.F., Editor. US-EPA, Research Triangle Park, NC, USA

(29) Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959), A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911-917.

(30) Gardner W.S., Frez W.A., Cichocki E.A. and Parrish C.C. (1985), Micromethod for lipids in aquatic invertebrates. Limnol. Oceanogr. 30: 1099-1105.

(31) Smedes F. (1999), Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst. 124: 1711-1718.

(32) OCDE (2006), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. ENV/JM/MONO(2006)18. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼**M7**

(33) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

(34) Springer T.A. (2009), Statistical Research Related to Update of OECD Guideline 305. Wildlife International, Ltd, Easton, MD, USA.

(35) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(36) Parkerton T., Letinski D., Febbo E., Davi R., Dzambia C., Connelly M., Christensen K. and Peterson D. (2001), A practical testing approach for assessing bioaccumulation potential of poorly water soluble organic chemicals (presentation). in SETAC Europe 12th Annual Meeting: Madrid, Spain.

(37) Fisk A.T., Cymbalisty C.D., Bergman Ã. and Muir D.C.G. (1996), Dietary accumulation of $C_{12}$- and $C_{16}$-chlorinated alkanes by juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 15: 1775-1782.

(38) Anónimo (2004), Fish, dietary bioaccumulation study — Basic protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(39) Anónimo (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(40) Bruggeman W.A., Opperhuizen A., Wijbenga A. and Hutzinger O. (1984), Bioaccumulation of super-lipophilic chemicals in fish, Toxicol. Environ. Chem. 7: 173-189.

(41) Muir D.C.G., Marshall W.K. and Webster G.R.B. (1985), Bioconcentration of PCDDs by fish: effects of molecular structure and water chemistry. Chemosphere. 14: 829-833.

(42) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(43) Nichols J.W., Fitzsimmons P.N. and Whiteman F.W. (2004), A physiologically based toxicokinetic model for dietary uptake of hydrophobic organic compounds by fish: II. Stimulation of chronic exposure scenarios. Toxicol. Sci. 77: 219-229.

(44) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(45) Sijm D.T.H.M. and van der Linde A. (1995), Size-dependent bioconcentration kinetics of hydrophobic organic chemicals in fish based on diffusive mass transfer and allometric relationships. Environ. Sci. Technol. 29: 2769-2777.

(46) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(47) Fisk A.T., Norstrom R.J., Cymbalisty C.D. and Muir D.G.G. (1998), Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. Environ. Toxicol. Chem. 17: 951-961.

(48) McGrath J.A., Parkerton T.F. and Di Toro D.M. (2004), Application of the narcosis target lipid model to algal toxicity and deriving predicted-no-effect concentrations. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2503-2517.

(49) Poppendieck D.G. (2002), Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Desorption Mechanisms from Manufactured Gas Plant Site Samples. Dissertation. Department of Civil, Architectural and Environmental Engineering, University of Texas, Austin, TX, USA.

▼**M7**

(50) McCarty L.S. and Mackay D. (1993), Enhancing ecotoxicological modelling and assessment: body residues and modes of toxic action. Environ. Sci. Technol. 27: 1718-1728.

(51) OCDE (2012), OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 175: Part I — Validation Report of a ring test for the OECD TG 305 dietary exposure bioaccumulation fish test. Part II — Additional Report including comparative analysis of trout and carp results ENV/JM/MONO(2012)20. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris, France.

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES Y UNIDADES

La eficiencia de la asimilación (α) es una medida de la cantidad relativa de sustancia absorbida desde el intestino al organismo (α carece de unidades, pero a menudo se expresa en porcentaje y no en fracción).

Por bioacumulación se entiende en general un proceso por el que la concentración de la sustancia en un organismo alcanza un nivel que supera el del medio respiratorio (por ejemplo, el agua en el caso de los peces o el aire en el de los mamíferos), el de los alimentos, o ambos (1).

Bioconcentración es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo (o en tejidos específicos de este) respecto a la concentración de esta sustancia en el medio ambiente.

El factor de bioconcentración (FBC o $K_B$) en cualquier momento durante la fase de absorción de este ensayo de acumulación es la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de los peces o en determinados tejidos suyos ($C_f$,en mg/kg), dividida por la concentración de la sustancia en el medio ambiente ($C_w$, en mg/l). El FBC se expresa en $l \cdot kg^{-1}$. Obsérvese que no se tienen en cuenta las correcciones según el crecimiento ni el contenido lipídico normal.

La biomagnificación es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo (o en tejidos específicos de este) respecto a la concentración de esta sustancia en el alimento.

El factor de biomagnificación (BMF) es la concentración de una sustancia en un depredador respecto a la concentración en la presa del depredador (o en su alimento) en el estado de equilibrio. En el método descrito aquí, la exposición a través de la fase acuosa se evita cuidadosamente, por lo que es imposible comparar directamente el valor del FBM obtenido mediante este método de ensayo con el valor el FBM obtenido a partir de un estudio de campo (en el que puede combinarse la exposición alimentaria con la acuática).

En este método de ensayo se utiliza el término» factor de biomagnificación alimentario «(FBM alimentario) para describir el resultado del ensayo de exposición alimentaria, en el que se evita cuidadosamente la exposición a través de la fase acuosa, por lo que es imposible comparar directamente el valor del FBM alimentario obtenido mediante este método de ensayo con el valor del FBM obtenido a partir de un estudio de campo (en el que puede combinarse la exposición alimentaria con la acuática).

La fase de depuración o de post-exposición (pérdida) es el tiempo, tras la transferencia de los peces de ensayo de un medio que contiene la sustancia problema a un medio libre de esta, durante el cual se estudia la depuración (o pérdida neta) de la sustancia a partir de los peces del ensayo (o de sus tejidos específicos).

La constante de la velocidad de depuración (pérdida) ($k_2$) es el valor numérico que define la velocidad de disminución de la concentración de la sustancia problema en los peces de ensayo (o en sus tejidos específicos) tras su transferencia de un medio que contiene la sustancia problema a un medio que está libre de ella ($k_2$ se expresa en $día^{-1}$).

El carbono orgánico disuelto (COD) es una medida de la concentración del carbono procedente de fuentes orgánicas disueltas en los medios de ensayo.

La fase de exposición o de absorción es el tiempo durante el cual se exponen los peces a la sustancia problema.

La velocidad de la ingestión de alimento ($I$) es la cantidad media de alimento ingerida por cada pez cada día, en relación con el promedio estimado del peso corporal total del pez (expresada en términos de g de alimentos/g de pez/día).

▼M7

El factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) es la proporción de la constante de la velocidad de absorción, $k_1$, respecto a la constante de la velocidad de depuración, $k_2$ (es decir, $k_1/k_2$ — véanse las definiciones correspondientes en el presente apéndice). En principio, el valor debe ser comparable con el $FBC_{SS}$ (véase la definición más arriba), pero pueden producirse desviaciones si el estado de equilibrio no está seguro o si se han aplicado al FBC cinético correcciones según el crecimiento.

El factor de bioconcentración cinético normalizado según el contenido lipídico ($FBC_{KL}$) está normalizado respecto a un pez con un contenido lipídico del 5 %.

El factor de bioconcentración cinético normalizado según el contenido lipídico y corregido según el crecimiento ($FBC_{KgL}$) está normalizado respecto a un pez con un contenido lipídico del 5 % y corregido según el crecimiento durante el periodo de estudio, tal como se describe en el apéndice 5.

El factor de bioconcentración en estado de equilibrio normalizado según el contenido lipídico ($FBC_{SSL}$) está normalizado respecto a un pez con un contenido lipídico del 5 %.

Una sustancia de componentes múltiples se define a efectos de REACH como una sustancia que tiene más de un componente principal presente a una concentración de entre el 10 % y el 80 % (p/p).

El coeficiente de reparto octanol-agua ($K_{OW}$) es la relación de la solubilidad de una sustancia en *n*-octanol y en agua en el equilibrio (métodos A.8 (2), A.24 (3), A.23 (4)); también se expresa como $P_{OW}$. El logaritmo de $K_{OW}$ se utiliza como indicación del potencial de bioconcentración de una sustancia por los organismos acuáticos.

El carbono orgánico en partículas (COP) es una medida de la concentración del carbono procedente de fuentes orgánicas en suspensión en los medios de ensayo.

La microextracción en fase sólida (SPME) es una una técnica analítica sin disolventes elaborada para sistemas diluidos. En este método, una fibra recubierta con polímero se expone a la fase líquida o gaseosa que contiene el analito de interés. En general, se impone un tiempo mínimo de análisis, de manera que se establezcan condiciones de equilibrio entre las fases sólida y fluida con respecto a las especies medidas. A continuación, puede determinarse la concentración del analito de interés directamente de la fibra o después de extraerla de la fibra con un disolvente, en función de la técnica de determinación.

Se alcanza el estado de equilibrio en la representación gráfica de la concentración de la sustancia problema en los peces ($C_f$) en función del tiempo cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos de $C_f$ realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días presentan una diferencia máxima del ± 20 % entre sí, y no hay ningún aumento significativo de $C_f$ entre el primero y el último de los análisis sucesivos. Cuando se analizan muestras puestas conjuntamente, es necesario proceder al menos a cuatro análisis sucesivos. Si las sustancias problema se absorben con lentitud, se optará preferiblemente por intervalos semanales.

El factor de bioconcentración en estado de equilibrio ($FBC_{SS}$) no cambia notablemente durante un plazo de tiempo prolongado, siendo constante la concentración de la sustancia problema en el medio ambiente durante este mismo periodo (véase la definición del estado de equilibrio).

El carbono orgánico total (COT) es una medida de la concentración del carbono procedente de todas las fuentes orgánicas presentes en los medios de ensayo, con inclusión de las fuentes disueltas y en partículas.

La constante de la velocidad de absorción ($k_1$) es el valor numérico que define la velocidad de aumento de la concentración de la sustancia problema en la superficie o el interior de los peces del ensayo (o en tejidos específicos suyos) cuando se exponen a esta sustancia ($k_1$ se expresa en $l\ kg^{-1}$ $día^{-1}$).

Las sustancias de composición desconocida o variable, los productos complejos de reacción y los materiales biológicos se conocen como UVCB.

▼**M7**

Producto es una sustancia o mezcla.

Producto problema es una sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Gobas F.A.P.C., de Wolf W., Burkhard L.P., Verbruggen E. and Plotzke K. (2009), Revisiting bioaccumulation criteria for POPs and PBT assessments. Integr. Environ. Assess. Manag. 5: 624-637.

(2) Capítulo A.8 del presente anexo, *Coeficiente de reparto (n-octanol/agua): método de frasco de agitación.*

(3) Capítulo A.24 del presente anexo, *Coeficiente de reparto (n-octanol/agua), método de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).*

(4) Capítulo A.23 del presente anexo, *Coeficiente de reparto (1-octanol/agua): método de agitación lenta.*

▼M7

*Apéndice 2*

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE**

| Componente | Límite de concentración |
|---|---|
| Partículas | 5 mg/l |
| Carbono orgánico total | 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | 1 µg/l |
| Cloro residual | 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | 25 ng/l |
| Aluminio | 1 µg/l |
| Arsénico | 1 µg/l |
| Cromo | 1 µg/l |
| Cobalto | 1 µg/l |
| Cobre | 1 µg/l |
| Hierro | 1 µg/l |
| Plomo | 1 µg/l |
| Níquel | 1 µg/l |
| Cinc | 1 µg/l |
| Cadmio | 100 ng/l |
| Mercurio | 100 ng/l |
| Plata | 100 ng/l |

▼M7

*Apéndice 3*

**ESPECIES DE PECES RECOMENDADAS PARA EL ENSAYO**

| Especies recomendadas | Gamas de temperaturas recomendadas para los ensayos (°C) | Longitud total recomendada de los animales utilizados (en cm) (2) |
|---|---|---|
| *Danio rerio* (1)<br>(Teleostei, Cyprinidae)<br>(Hamilton-Buchanan) Pez cebra | 20 — 25 | 3,0 ± 0,5 |
| *Pimephales promelas*<br>(Teleostei, Cyprinidae)<br>(Rafinesque) Pez cabeza gorda | 20 — 25 | 5,0 ± 2,0 |
| *Cyprinus carpio*<br>(Teleostei, Cyprinidae)<br>(Linnaeus) Carpa común | 20 — 25 | 8,0 ± 4,0 (3) |
| *Oryzias latipes*<br>(Teleostei, Poecilliidae)<br>(Temminck y Schlegel) Medaka | 20 — 25 | 4,0 ± 1,0 |
| *Poecilia reticulata*<br>(Teleostei, Poeciliidae)<br>(Peters) Guppy | 20 — 25 | 3,0 ± 1,0 |
| *Lepomis macrochirus*<br>(Teleostei, Centrarchidae)<br>(Rafinesque) Agallas azules | 20 — 25 | 5,0 ± 2,0 |
| *Oncorhynchus mykiss*<br>(Teleostei, Salmonidae)<br>(Walbaum) Trucha arco iris | 13 — 17 | 8,0 ± 4,0 |
| *Gasterosteus aculeatus*<br>(Teleostei, Gasterosteidae)<br>(Linnaeus) Espinoso | 18 — 20 | 3,0 ± 1,0 |

(1) Meyer *et al.* (1)

(2) Cabe observar que en el propio ensayo se considera preferible el peso como medida para obtener el tamaño y la constante de la velocidad de crecimiento. Sin embargo, se sabe que la longitud es una medida más práctica si los peces han de seleccionarse visualmente al inicio de un experimento (es decir, de entre la población inicial).

(3) Este intervalo de longitud se indica en los métodos de ensayo relativos a las nuevas sustancias químicas, etc. basados en la Ley sobre el control de sustancias químicas de Japón (CSCL).

*Se han utilizado menos ampliamente distintas especies marinas y de estuario como, por ejemplo:*

| | |
|---|---|
| Verrugato croca | (*Leiostomus xanthurus*) |
| Petota | (*Cyprinodon variegatus*) |
| Pejerrey | (*Menidia beryllina*) |
| Perca brillante | (*Cymatogaster aggregata*) |
| Solla inglesa | (*Parophrys vetulus*) |
| Escorpión de espinas de ciervo | (*Leptocottus armatus*) |
| Espinoso | (*Gasterosteus aculeatus*) |
| Lubina | (*Dicentracus labrax*) |
| Alburno | (*Alburnus alburnus*) |

▼**M7**

Los peces de agua dulce enumerados en el cuadro anterior son fáciles de criar o están fácilmente disponibles a lo largo del año, mientras que la disponibilidad de las especies marinas o de estuario se limita en parte a los países correspondientes. Pueden reproducirse y desarrollarse en explotaciones piscícolas o en laboratorio, en condiciones donde las enfermedades y los parásitos están bajo control; los animales utilizados serán, pues, sanos y de origen conocido. Estos peces se encuentran en muchas partes del mundo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Meyer A., Biermann C.H. and Orti G. (1993), The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: An invitation to the comparative method Proc. R. Soc. Lond. B. 252: 231-236.

▼M7

*Apéndice 4*

## PAUTAS DE MUESTREO PARA ENSAYOS CON EXPOSICIÓN ALIMENTARIA Y ACUÁTICA

1. **Ejemplo teórico de pauta de muestreo para un ensayo completo de bioconcentración con exposición acuática de una sustancia con log $K_{ow}$ = 4.**

| Pauta de peces | Pauta de muestreo | | Número de muestras de agua (1) | Número de peces por muestra (1) |
|---|---|---|---|---|
| | Frecuencia mínima requerida (días) (2) | Muestreo adicional (días) (2) | | |
| Fase de absorción | | | | |
| 1 | -1 | | 2 (3) | 4 (4) |
| | 0 | | (2) | (3 (6)) |
| 2 | 0,3 | | 2 | 4 |
| | | 0,4 | (2) | (4) |
| 3 | 0,6 | | 2 | 4 |
| | | 0,9 | (2) | (4) |
| 4 | 1,2 | | 2 | 4 |
| | | 1,7 | (2) | (4) |
| 5 | 2,4 | | 2 | 4 |
| | | 3,3 | (2) | (4) |
| 6 | 4,7 | | 2 | 4 — 8 (5) |
| | | | | (3 (6)) |
| Fase de depuración | | | | Traslado de los peces a agua libre de sustancia problema |
| 7 | 5,0 | | 2 | 4 |
| | | 5,3 | | (4) |
| 8 | 5,9 | | 2 | 4 |
| | | 7,0 | | (4) |
| 9 | 9,3 | | 2 | 4 |
| | | 11,2 | | (4) |
| 10 | 14,0 | | 2 | 4 — 8 (5) |
| | | 17,5 | | (4+3 (6)) |
| TOTAL | | | | 40 — 72<br>(48 — 80) (5) |

(1) Los valores entre paréntesis son los números de muestras (agua, peces) que se toman si se procede a un muestreo suplementario.
(2) La estimación previa al ensayo del valor de $k_2$ con log $K_{OW}$ de 4,0 es 0,652 día$^{-1}$. La duración total del experimento se fija en 3 × $t_{SS}$ = 3 × 4,6 días, o sea 14 días. Para la estimación de $t_{SS}$, consúltese el apéndice 5.
(3) Muestra de agua tomada después de transferir al menos 3 «volúmenes de recipiente».
(4) Estos peces se muestrean de la población inicial.
(5) Si se necesitan estudios sobre el metabolismo o de mayor precisión que requieran más peces, deben tomarse las muestras de peces especialmente al final de las fases de absorción y de depuración (véase el punto 40).
(6) Pueden ser necesarios al menos tres peces adicionales para el análisis del contenido lipídico si no es posible utilizar los mismos peces muestreados para determinar las concentraciones de la sustancia al inicio del ensayo, al final de la fase de absorción y al final de la fase de depuración. Téngase en cuenta que en muchos casos debe ser posible utilizar solo los tres peces testigo (véase el punto 56).

▼M7

2. **Ejemplo teórico de pauta de muestreo para un ensayo de bioacumulación alimentaria de la sustancia tras una fase de absorción de 10 días y una fase de depuración de 42 días.**

| Muestreo | Pauta de muestreo | | Número de muestras de alimento | Número de peces por muestra | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Día de la fase | ¿Muestras de peces adicionales? | | Grupo de ensayo | Grupo testigo |
| Fase de absorción | | | | | |
| 1 | 0 | Posible (1) (2) | 3 — grupo de ensayo | 0 | 5 — 10 |
| | | | 3 — grupo testigo (1) | | (8 — 13) (2) |
| 1A (3) | 1-3 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 2 | 10 | Sí (4) | 3 — grupo de ensayo | 10 — 15 (4) | 5 — 10 |
| | | | 3 — grupo testigo (1) | (13 — 18) (5) | (8 — 13) (5) |
| Fase de depuración | | | | | |
| 3 | 1 | Sí (4) | | 10 — 15 (4) | 5 — 10 |
| 4 | 2 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 5 | 4 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 6 | 7 | Sí (4) | | 10 — 15 (4) | 5 — 10 |
| 7 | 14 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 8 | 28 | | | 5 — 10 | 5 — 10 |
| 9 | 42 | Sí (4) | | 10 — 15 (4)<br>(13 — 18) (5) | 5 — 10<br>(8 — 13) (5) |
| TOTAL | | | | 59 — 120<br>(63 — 126) (4) (5) | 50 — 110<br>(56 — 116) (4) (5) |

(1) Tres muestras de alimento procedentes tanto del grupo de ensayo como del testigo se analizan para medir las concentraciones de la sustancia problema y el contenido lipídico.

(2) Los peces se muestrean de la población inicial lo más cerca posible del comienzo del estudio; deben muestrearse al menos tres peces de la población inicial al comienzo del ensayo para determinar en ellos el contenido lipídico.

(3) El muestreo (optativo) al inicio de la fase de absorción proporciona datos para calcular la asimilación alimentaria de la sustancia problema que pueda compararse con la eficiencia de la asimilación calculada a partir de los datos de la fase de depuración.

(4) Podrán muestrearse cinco peces adicionales para efectuar análisis específicos de cada tejido.

(5) Pueden ser necesarios al menos tres peces adicionales para el análisis del contenido lipídico si no es posible utilizar los mismos peces muestreados para determinar las concentraciones de la sustancia al inicio del ensayo, al final de la fase de absorción y al final de la fase de depuración. Téngase en cuenta que en muchos casos debe ser posible utilizar solo los tres peces testigo (véanse los puntos 56 y 153).

**Nota sobre los momentos de las fases y del muestreo:** La fase de absorción comienza con el primer aporte del alimento enriquecido. Un día experimental va desde un aporte de alimento hasta poco antes del siguiente, 24 horas después. El primer muestreo (1 en el cuadro) debe efectuarse poco antes del primer aporte de alimento (por ejemplo, una hora). Lo ideal es que el muestreo durante un estudio se lleve a cabo poco antes del aporte de alimento del día siguiente (es decir, unas 23 horas después del aporte de alimento del día de la muestra). La fase de absorción termina poco antes del primer aporte de alimento no enriquecido, cuando comienza la fase de depuración (es probable que los peces del grupo de ensayo estén aún digiriendo alimento enriquecido en el intervalo de 24 horas después del último aporte de alimento enriquecido). Esto significa que la muestra del final de la absorción debe tomarse poco antes del primer aporte de alimento no enriquecido y que la primera muestra de la fase de depuración debe tomarse unas 23 horas después del primer aporte de alimento no enriquecido.

▼M7

*Apéndice 5*

## CÁLCULOS GENERALES

1. Introducción

2. Previsión de la duración de la fase de absorción

3. Previsión de la duración de la fase de depuración

4. Método secuencial: determinación de la constante de la velocidad de depuración (pérdida) $k_2$

5. Método secuencial: determinación de la constante de la velocidad de absorción $k_1$ (método de exposición acuática únicamente)

6. Método simultáneo de cálculo de las constantes de velocidad de absorción y de depuración (pérdida) (método de exposición acuática únicamente)

7. Corrección según la dilución debida al crecimiento para calcular el FBC cinético y el FBM

8. Normalización respecto a los lípidos a un contenido lipídico del 5 % (método de exposición acuática únicamente)

1. INTRODUCCIÓN

El modelo general de bioacumulación acuática de los peces puede describirse en términos de procesos de absorción y de pérdida, ignorando la absorción con el alimento. La ecuación diferencial ($dC_f/dt$) que describe la velocidad del cambio de la concentración en los peces (mg·kg$^{-1}$·día$^{-1}$) viene dada por (1):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \times C_w - (k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f \qquad \text{[Ecuación A5.1]}$$

Donde:

$k_1$ = constante de la velocidad de primer orden de la absorción en los peces (l·kg$^{-1}$·día$^{-1}$).

$k_2$ = constante de la velocidad de primer orden de la depuración de los peces (día$^{-1}$).

$k_g$ = constante de la velocidad de primer orden del crecimiento de los peces («dilución debida al crecimiento») (día$^{-1}$).

$k_m$ = constante de la velocidad de primer orden de la transformación metabólica (día$^{-1}$).

$k_e$ = constante de la velocidad de primer orden de la excreción por las heces (día$^{-1}$).

$C_w$ = concentración en el agua (mg·l$^{-1}$).

$C_f$ = concentración en los peces (mg·kg$^{-1}$ peso húmedo).

Para las sustancias bioacumulativas, cabe esperar que una media ponderada en función del tiempo (TWA) sea la concentración en el agua más importante desde el punto de vista de la exposición ($C_w$) dentro del margen permitido de fluctuación (véase el punto 24). Se recomienda calcular una concentración TWA en el agua, de acuerdo con el procedimiento establecido en el apéndice 6 del método de ensayo C.20 (2). Conviene señalar que es conveniente utilizar el logaritmo natural de la concentración en el agua cuando se espera una disminución exponencial entre los periodos de renovación, por ejemplo en un diseño de ensayo semiestático. En un sistema dinámico puede que no sea necesario recurrir a los logaritmos naturales de las concentraciones de exposición. En caso de que se obtengan las concentraciones TWA en el agua, deben notificarse y utilizarse en los cálculos posteriores.

En un ensayo normal de FBC en peces, la absorción y la depuración de ensayo pueden describirse en términos de dos procesos de cinética de primer orden.

▼M7

Velocidad de absorción= $k_1 \times C_w$ [Ecuación A5.2]

Velocidad de pérdida general = $(k_2 + k_g + k_m + k_e) \times C_f$ [Ecuación A5.3]

En el estado de equilibrio, suponiendo que el crecimiento y el metabolismo son despreciables (es decir, que los valores de $k_g$ y $k_m$ no pueden distinguirse de cero), la velocidad de absorción es igual a la velocidad de depuración, por lo que combinando la ecuación A5.2 y la ecuación A5.3 se obtiene la relación siguiente:

$$FBC = \frac{C_{f-SS}}{C_{w-SS}} = \frac{k_1}{k_2}$$ [Ecuación A5.4]

Donde:

$C_{f\text{-}SS}$ = concentración en los peces en el estado de equilibrio ($mg \cdot kg^{-1}$ peso húmedo).

$C_{w\text{-}SS}$ = concentración en el agua en el estado de equilibrio ($mg \cdot l^{-1}$).

La relación $k_1/k_2$ se conoce como el FBC cinético ($FBC_K$) y debe ser igual al FBC en el estado de equilibrio ($FBC_{SS}$) obtenido de la proporción de la concentración en el estado de equilibrio en los peces respecto a la concentración en el agua, pero pueden darse desviaciones si el estado de equilibrio es dudoso o si se han aplicado al FBC cinético correcciones según el crecimiento. Sin embargo, como $k_1$ y $k_2$ son constantes, no es necesario llegar al estado de equilibrio para derivar el valor del $FBC_K$.

A partir de estas ecuaciones de primer orden, el presente apéndice 5 incluye los cálculos generales necesarios para los métodos de bioacumulación con exposición tanto alimentaria como acuática. Sin embargo, las secciones 5, 6 y 8 solo son pertinentes para el método con exposición acuática, pero se incluyen aquí por ser técnicas «generales». Los métodos secuencial (secciones 4 y 5) y simultáneo (sección 6) permiten el cálculo de las constantes de absorción y de depuración que sirven para derivar los FBC cinéticos. El método secuencial para determinar $k_2$ (sección 4) es importante para el método alimentario, ya que esta constante es necesaria para calcular tanto la eficiencia de la asimilación como el FBM. En el apéndice 7 se detallan los cálculos que son específicos del método alimentario.

2. PREVISIÓN DE LA DURACIÓN DE LA FASE DE ABSORCIÓN

Antes de realizar el ensayo, puede obtenerse una estimación de $k_2$ y, en consecuencia, un porcentaje del tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio, a partir de relaciones empíricas entre $k_2$ y el coeficiente de reparto *n*-octanol/agua ($K_{OW}$) o $k_1$ y el FBC. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que las ecuaciones de esta sección solo son aplicables en caso de que la absorción y la depuración sigan una cinética de primer orden. Si claramente esto no es así, se recomienda solicitar consejo a un bioestadístico o a un técnico de farmacocinética, si resulta deseable prever la fase de absorción.

Puede obtenerse por diversos métodos una estimación de $k_2$ ($día^{-1}$). Por ejemplo, pueden utilizarse en primera instancia las siguientes relaciones empíricas ([1]):

$\log k_2 = 1{,}47 - 0{,}414 log K_{OW}$ ($r^2 = 0{,}95$) [(3); [Ecuación A5.5]

o bien

$$k_2 = \frac{k_1}{FBC}$$ [Ecuación A5.6]

Donde $k_1 = 520 \times W^{-0{,}32}$ (para sustancias con $\log K_{OW} > 3$) ($r^2 = 0{,}85$) [(4); [Ecuación A5.7]

([1]) Tal y como ocurre con cada relación empírica, debe verificarse que la sustancia problema está incluida en el ámbito de aplicabilidad de la relación.

▼M7

$$\mathrm{Y}FBC = 10^{(0{,}910 \cdot logK_{OW} - 1{,}975 \cdot log(6{,}8 \cdot 10^{-7} K_{OW} + 1) - 0{,}786)} \qquad (r^2 = 0{,}90)\ [(5);\ [\text{Ecuación A5.8}]$$

$W$ = peso medio de los peces tratados (gramos de peso húmedo) al final de la absorción / inicio de la depuración ([1])

Para otras relaciones correspondientes, véase (6). Puede ser ventajoso utilizar modelos más complicados en la estimación de $k_2$ si, por ejemplo, resulta probable que haya un importante metabolismo (7) (8). Sin embargo, al aumentar la complejidad del modelo, debe prestarse más atención a la interpretación de las predicciones. Por ejemplo, la presencia de grupos nitro puede indicar rápido metabolismo, pero esto no es siempre así. El usuario debe, por lo tanto, ponderar los resultados obtenidos con el método predictivo respecto a la estructura química y cualquier otra información pertinente (por ejemplo, estudios preliminares) para programar un estudio.

El tiempo necesario para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio puede obtenerse, aplicando la estimación de $k_2$, a partir de la ecuación cinética general que describe la absorción y la depuración (cinética de primer orden), suponiendo que el crecimiento y el metabolismo son insignificantes. Si se produce crecimiento sustancial durante el estudio, no serán fiables las estimaciones descritas a continuación. En tales casos, es mejor utilizar la $k_{2g}$ corregida según el crecimiento como se describe más adelante (véase la sección 7 del presente apéndice):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_W - k_2 C_f \qquad [\text{Ecuación A5.9}]$$

o, si $C_w$ es constante:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W (1 - e^{-k_2 t}) \qquad [\text{Ecuación A5.10}]$$

Cuando se aproxima el estado de equilibrio ($t \to \infty$), la ecuación A5.10 puede reducirse (véase (9) (10)) a:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_W \qquad [\text{Ecuación A5.11}]$$

o bien

$$\frac{C_f}{C_w} = \frac{k_1}{k_2} = FBC \qquad [\text{Ecuación A5.12}]$$

Entonces, FBC × $C_w$ es una aproximación a la concentración en los peces en el estado de equilibrio ($C_{f\text{-}SS}$). [Nota: El mismo enfoque puede utilizarse en la estimación de un FBM en el estado de equilibrio con el ensayo alimentario. En este caso, en las ecuaciones anteriores el FBC se sustituye por el BMF y $C_w$ por $C_{food}$, concentración en el alimento]

La ecuación A5.10 puede transcribirse así:

$$C_f = C_{f\ -SS}(1 - e^{-k_2 t}) \qquad [\text{Ecuación A5.13}]$$

o bien

$$\frac{C_f}{C_{f\ -SS}} = 1 - e^{-k_2 t} \qquad [\text{Ecuación A5.14}]$$

Aplicando la ecuación A5.14, puede preverse el tiempo necesario para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio cuando $k_2$ se ha estimado previamente con ayuda de las ecuaciones A5.5 o A5.6.

A título indicativo, la duración estadísticamente óptima de la fase de absorción que permite obtener datos estadísticamente aceptables ($FBC_K$) es el periodo necesario para que la curva del logaritmo de la concentración de la

([1]) El peso de los peces al final de la fase de absorción puede estimarse a partir de los datos de estudios anteriores o del conocimiento del aumento probable de tamaño de la especie de ensayo a partir del peso típico al inicio del ensayo a lo lago de una duración típica de la absorción (por ejemplo, 28 días).

▼M7

sustancia problema en los peces, representado frente al tiempo lineal, llegue al menos al 50 % del estado de equilibrio (es decir, 0,69/$k_2$), pero sin sobrepasar el 95 % del estado de equilibrio (es decir, 3,0/$k_2$) (11). En caso de que la acumulación rebase el 95 % del estado de equilibrio, se hace posible calcular un $FBC_{SS}$.

El tiempo necesario para alcanzar el 80 por ciento del estado de equilibrio es (utilizando la ecuación A5.14):

$$0{,}80 = 1 - e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ecuación A5.15]}$$

o bien

$$t_{80} = \frac{-\ln(0{,}20)}{k_2} = \frac{1{,}6}{k_2} \qquad \text{[Ecuación A5.16]}$$

Análogamente, el tiempo necesario para alcanzar el 95 % del estado de equilibrio es:

$$t_{95} = \frac{-ln(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2} \qquad \text{[Ecuación A5.17]}$$

Por ejemplo, la duración de la fase de absorción (es decir, el tiempo para alcanzar un determinado porcentaje del estado de equilibrio, p. ej. $t_{80}$ o $t_{95}$) en el caso de una sustancia problema con log $K_{OW}$ = 4 sería (utilizando las ecuaciones A5.5, A5.16 y A5.17):

$$logk_2 = 1{,}47 - 0{,}414 \cdot 4$$

$$k_2 = 0{,}652 \text{ día}^{-1}$$

$$t_{80} = \frac{1{,}6}{0{,}652} = 2{,}45\ días(59horas)$$

o bien $t_{95} = \frac{3{,}0}{0{,}652} = 4{,}60\ días(110horas)$

Se puede utilizar, como alternativa, la expresión:

$$t_{eSS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot K_{OW} + 55{,}31\ (horas) \qquad \text{[Ecuación A5.18]}$$

para calcular el tiempo de llegada al estado de equilibrio efectivo ($t_{eSS}$ ) (12). En el caso de una sustancia problema con log $K_{OW}$ = 4, el resultado es:

$$\&\#x1d461;_{\&\#x1d452;\ SS} = 6{,}54 \cdot 10^{-3} \cdot 10^{4} + 55{,}31 = 121\ horas$$

3. PREVISIÓN DE LA DURACIÓN DE LA FASE DE DEPURACIÓN

Es posible obtener también una previsión del tiempo necesario para reducir la carga corporal hasta un determinado porcentaje de la concentración inicial, a partir de la ecuación general que describe la absorción y la depuración (suponiendo una cinética de primer orden, véase la ecuación A5.9 (1) (13)).

Para la fase de depuración, se supone que $C_w$ (o $C_{food}$ en caso de ensayo alimentario) es cero. La ecuación puede reducirse entonces a:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_2 C_f \qquad \text{[Ecuación A5.19]}$$

o bien

$$C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t} \qquad \text{[Ecuación A5.20]}$$

donde $C_{f,0}$ es la concentración al principio del periodo de depuración.

Se llegará así a una depuración del 50 % en el tiempo ($t_{50}$):

▼M7

$$\frac{C_f}{C_{f,0}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}}$$

o bien

$$t_{50} = \frac{-ln\,(0{,}50)}{k_2} = \frac{0{,}693}{k_2}$$

Del mismo modo, el 95 % de depuración se alcanzará en el tiempo:

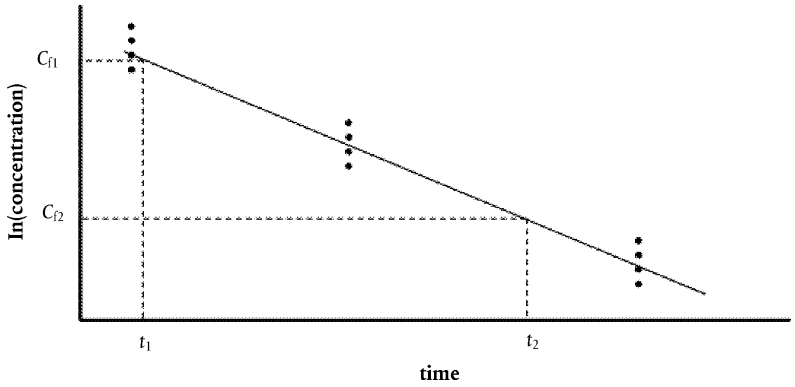
$$t_{95} = \frac{-ln\,(0{,}05)}{k_2} = \frac{3{,}0}{k_2}$$

Si se utiliza el 80 % de la absorción para el primer periodo ($1{,}6/k_2$) y el 95 % de pérdida en la fase de depuración ($3{,}0/k_2$), entonces la fase de depuración durará aproximadamente el doble de la fase de absorción.

Téngase en cuenta que estas estimaciones se basan en la hipótesis de que los procesos de absorción y de depuración siguen una cinética de primer orden. Si es evidente que no se sigue una cinética de primer orden, estas estimaciones no son válidas.

4. MÉTODO SECUENCIAL: DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE LA VELOCIDAD DE DEPURACIÓN (PÉRDIDA) $K_2$

Se supone que la mayoría de los datos de bioconcentración se describen «razonablemente» bien con un modelo simple de dos compartimentos / dos parámetros, según indica la curva rectilínea que une aproximadamente los puntos de las concentraciones en los peces (en escala de logaritmos naturales) durante la fase de depuración.




Obsérvese que las desviaciones en relación con esta línea recta pueden indicar un proceso de depuración más complejo que una cinética de primer orden. Puede aplicarse el método gráfico para solucionar los tipos de depuración que se desvíen de la cinética de primer orden.

Para calcular $k_2$ en caso de múltiples puntos temporales (de muestreo), debe realizarse una regresión lineal de ln (concentración) frente al tiempo. La pendiente de la línea de regresión es una estimación de la constante de la velocidad de depuración $k_2$ ([1]). De la ordenada en el origen puede calcularse fácilmente la concentración media en los peces al principio de la fase de depuración ($C_{0,d}$; que es igual a la concentración media en los peces al final de la fase de absorción) (incluidos los márgenes de error) ([2]):

([1]) En la mayoría de programas que permiten realizar la regresión lineal, también se dan los errores típicos y el intervalo de confianza (IC) de las estimaciones como, por ejemplo, en Microsoft Excel utilizando el paquete de herramientas de análisis de datos.

▼M7

$$C_{0,d} = e^{\text{ordenada en origen}} \qquad \text{[Ecuación A5.21]}$$

Para calcular $k_2$ cuando solo se dispone de dos puntos temporales (de muestreo) (como en el diseño minimizado), deben sustituirse las dos concentraciones medias en la ecuación siguiente:

$$k_2 = \frac{\ln\ (C_{fl})\ -\ \ln\ (C_{f2})}{t_{\ 2}\ -\ t_1} \qquad \text{[Ecuación A5.22]}$$

Donde ln ($C_{f1}$) y ln ($C_{f2}$) son los logaritmos naturales de las concentraciones a los tiempos $t_1$ y $t_2$, respectivamente, y $t_2$ y $t_1$ son los tiempos a los que se toman las dos muestras respecto al inicio de la depuración ([1]).

5. MÉTODO SECUENCIAL: DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE LA VELOCIDAD DE ABSORCIÓN $K_1$ (MÉTODO DE EXPOSICIÓN ACUÁTICA ÚNICAMENTE)

Para hallar un valor de $k_1$ a partir de un conjunto de datos secuenciales de concentración a lo largo del tiempo durante la fase de absorción, debe utilizarse un programa informático para ajustarse al modelo siguiente:

$$C_f(t) = C_w(t) \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad \text{[Ecuación A5.23]}$$

Donde $k_2$ viene dada por el cálculo anterior, y $C_f\,(t)$ y $C_w\,(t)$ son las concentraciones en los peces y en el agua, respectivamente, al tiempo $t$.

Para calcular $k_1$ cuando solo se dispone de dos puntos temporales (de muestreo) (como en el diseño minimizado), debe utilizarse la fórmula siguiente:

$$k_1 = \frac{C_{\ f}\ \cdot k_2}{C_w(1\ -\ e^{-k_2 t})} \qquad \text{[Ecuación A5.24]}$$

Donde $k_2$ viene dada por el cálculo anterior, $C_f$ es la concentración en los peces al inicio de la fase de depuración, y $C_w$ es la concentración media en el agua durante la fase de absorción ([2]).

Para evaluar la calidad del ajuste puede recurrirse a la inspección visual de las pendientes $k_1$ y $k_2$ en la representación gráfica frente a los datos medidos en los puntos de muestreo. Si resulta que el método secuencial da una estimación deficiente de $k_1$, debe aplicarse el enfoque simultáneo para calcular $k_1$ y $k_2$ (véase la sección 6 siguiente). También aquí, las pendientes resultantes deben compararse con la representación gráfica de los datos medidos para la inspección visual de la calidad del ajuste. Si la calidad del ajuste sigue siendo baja, puede constituir un indicador de que no se aplica una cinética de primer orden y de que deben emplearse otros modelos más complejos.

6. MÉTODO SIMULTÁNEO DE CÁLCULO DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE ABSORCIÓN Y DE DEPURACIÓN (PÉRDIDA) (MÉTODO DE EXPOSICIÓN ACUÁTICA ÚNICAMENTE)

Pueden utilizarse programas informáticos para hallar los valores de $k_1$ y $k_2$ en función de un conjunto de datos secuenciales de concentración a lo largo del tiempo y del modelo:

$$C_f = C_{\ w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{\ -k_2 t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[Ecuación A5.25]}$$

$$C_f = C_{\ w} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (e^{\ -k_2(t\ -\ t_c)}\ -\ e^{\ -k_2 t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[Ecuación A5.26]}$$

donde

$t_c$ = tiempo al final de la fase de absorción.

Este enfoque ofrece directamente errores típicos de las estimaciones de $k_1$ y $k_2$. Cuando $k_1/k_2$ se sustituye por el FBC (véase la ecuación A5.4) en las ecuaciones A5.25 y A5.26, pueden calcularse también el error típico y el IC del 95 % del FBC. Esto es especialmente útil cuando se comparan distintas

([1]) En contraste con el método de la regresión lineal, la utilización de esta fórmula no da un error típico para k2.

([2]) En contraste con un método de ajuste lineal, este método generalmente no da un error típico o intervalo de confianza para la estimación de k1.

▼M7

estimaciones debido a la transformación de los datos. La variable dependiente (concentración en los peces) puede ajustarse con o sin transformación logarítmica natural, y puede evaluarse la incertidumbre del FBC resultante.

Como existe una fuerte correlación entre los dos parámetros $k_1$ y $k_2$ si se estiman simultáneamente, puede ser conveniente calcular primero $k_2$ a partir de los datos de depuración solamente (véase más arriba); $k_2$ en la mayoría de los casos puede estimarse a partir de la curva de depuración con una precisión relativamente elevada. $k_1$ puede calcularse posteriormente a partir de los datos de absorción utilizando una regresión no lineal [1]. Se aconseja utilizar la misma transformación de los datos cuando se hace el ajuste secuencial.

Para evaluar la calidad del ajuste puede recurrirse a la inspección visual de las pendientes resultantes en la representación gráfica frente a los datos medidos en los puntos de muestreo. Si resulta que este método da una estimación deficiente de $k_1$, puede aplicarse el enfoque simultáneo para calcular $k_1$ y $k_2$. También aquí ha de compararse el modelo ajustado frente a los datos medidos representados gráficamente para la inspección visual de la calidad del ajuste y las estimaciones de los parámetros resultantes de $k_1$, $k_2$ y FBC resultante y sus errores típicos y/o intervalos de confianza deben compararse entre diferentes tipos de ajuste.

Si la calidad del ajuste es baja, puede constituir un indicador de que no se sigue una cinética de primer orden y de que deben emplearse otros modelos más complejos. Una de las dificultades más comunes es el crecimiento de los peces durante el ensayo.

7. CORRECCIÓN SEGÚN LA DILUCIÓN DEBIDA AL CRECIMIENTO PARA CALCULAR EL FBC CINÉTICO Y EL FBM

En la presente sección se describe un método de referencia para la corrección del efecto del crecimiento de los peces durante el ensayo (denominado «dilución debida al crecimiento»), que solo es válido cuando se sigue la cinética de primer orden. En caso de que existan indicios de que no se sigue tal cinética, se recomienda solicitar consejo a un bioestadístico sobre la corrección adecuada de la dilución debida al crecimiento o utilizar el enfoque de masa que se describe a continuación.

En ciertos casos, este método de corregir la dilución debida al crecimiento adolece de falta de precisión o a veces no funciona (por ejemplo, cuando se estudian con peces de rápido crecimiento sustancias que se depuran muy despacio, la constante de la velocidad de depuración derivada corregida según la dilución debida al crecimiento, $k_{2g}$, puede ser muy pequeña, por lo que el error en las dos constantes de velocidad utilizadas para obtenerla se hace crítico, y a veces las estimaciones de $k_g$ pueden ser mayores que $k_2$). En tales casos puede utilizarse un enfoque alternativo (es decir, el enfoque de masa), que también funciona cuando el crecimiento no sigue una cinética de primer orden, lo que evita la necesidad de la corrección. Este enfoque se expone al final de la presente sección.

**Método de sustracción de la constante de la velocidad de crecimiento para la corrección según el crecimiento**

Con el método de referencia, todos los datos individuales de peso y longitud se convierten en logaritmos naturales y el ln (peso) o el ln (1/peso) se representa frente al tiempo (días), por separado para los grupos de tratamiento y de testigo. El mismo proceso se lleva a cabo con los datos de las fases de absorción y de depuración por separado. Por lo general, a efectos de corrección de la dilución debida al crecimiento es más apropiado utilizar los datos de peso de todo el estudio para derivar la constante de la velocidad de crecimiento ($k_g$), pero unas diferencias estadísticamente significativas entre

[1] Hay que tener en cuenta que la incertidumbre en la estimación de k2 no se utiliza correctamente en el modelo de bioacumulación cuando se considera esencialmente como constante al ajustar k1 en el método de ajuste secuencial. La incertidumbre del FBC resultante será, por tanto, diferente con los métodos de ajuste secuencial y simultáneo.

▼M7

las constantes de velocidad de crecimiento derivadas para la fase de absorción y para la fase de depuración pueden indicar que debe utilizarse la constante de velocidad de la fase de depuración. Las velocidades de crecimiento generales procedentes de estudios acuáticos correspondientes a los grupos de ensayo y testigo pueden utilizarse para comprobar si hay efectos relacionados con el tratamiento.

Se calcula una correlación lineal de mínimos cuadrados para la gráfica del ln (peso de los peces) (y del ln (1/peso)) frente al tiempo en días para cada grupo (grupos de ensayo y testigos, datos individuales, no valores medios diarios) para todo el estudio, las fases de absorción y de depuración utilizando procedimientos estadísticos normales. Se calculan las varianzas de las pendientes de las rectas y se utilizan para evaluar la significación estadística (p = 0,05) de la diferencia en las pendientes (constantes de la velocidad de crecimiento) utilizando la prueba t de Student (o ANOVA si se somete a ensayo más de una concentración). En general se prefieren los datos de peso a efectos de la corrección según el crecimiento. Los datos de longitud, tratados de la misma forma, pueden ser útiles para comparar los grupos testigo y de ensayo en cuanto a los efectos relacionados con el tratamiento. Si no hay diferencias estadísticamente significativas en el análisis de los datos de peso, podrán mezclarse los datos de los grupos testigo y de ensayo, y calcularse una constante general de la velocidad de crecimiento de los peces para el estudio ($k_g$), como la pendiente general de la correlación lineal. Si se observan diferencias estadísticamente significativas, se presentarán por separado las constantes de la velocidad de crecimiento de cada grupo y/o fase del estudio. A continuación debe utilizarse la constante de velocidad de cada grupo tratado con fines de corrección según la dilución debida al crecimiento de ese grupo. Si se observan diferencias estadísticas entre las constantes de velocidad de la fase de absorción y de la de depuración, deben utilizarse las constantes de velocidad derivadas de la fase de depuración.

La constante calculada de la velocidad de crecimiento ($k_g$ expresada en día$^{-1}$) puede sustraerse de la constante general de la velocidad de depuración ($k_2$) para dar la constante de la velocidad de depuración, $k_{2g}$.

$$k_{2\ g} = k_2 - k_g \qquad \text{[Ecuación A5.27]}$$

La constante de la velocidad de absorción se divide por la constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento para obtener el FBC cinético corregido según el crecimiento, denominado $FBC_{Kg}$ (o $FBM_{Kg}$).

$$FBC_{Kg} = \frac{k_1}{k_{2g}} \qquad \text{[Ecuación A5.28]}$$

La constante de la velocidad de crecimiento obtenida con un estudio alimentario se utiliza en la ecuación A7.5 para calcular el $FBM_{Kg}$ corregido según el crecimiento (véase el apéndice 7).

**Método de la masa para la corrección según el crecimiento**

Puede utilizarse como se indica a continuación una alternativa al anterior «método de sustracción de la constante de la velocidad de crecimiento» que evita la necesidad de corregir según el crecimiento. El principio consiste en utilizar los datos de depuración referidos a la masa del pez entero, y no en función de la concentración.

Se convierten las concentraciones tisulares de la fase de depuración (masa de sustancia problema / unidad de masa del pez) en masa de sustancia problema /pez: se emparejan las concentraciones y los pesos de cada pez en forma tabular (por ejemplo, con una hoja de cálculo informatizada) y se multiplica cada concentración por el peso total del pez correspondiente para obtener un conjunto de datos de masa de sustancia problema por pez correspondientes a todas las muestras de la fase de depuración.

Se representa gráficamente el logaritmo natural de los datos de masa de sustancia resultantes frente al tiempo para el experimento (fase de depuración) tal y como se haría normalmente.

▼M7

Con el método de exposición acuática se deriva normalmente la constante de la velocidad de absorción (véanse las secciones 4 y 6) (obsérvese que el valor de $k_2$ «normal» debe utilizarse en las ecuaciones de ajuste de la curva para $k_1$) y se deriva la constante de la velocidad de depuración a partir de los datos anteriores. Como el valor resultante de la constante de la velocidad de depuración es independiente del crecimiento, puesto que se ha obtenido en función de la masa por pez entero, debe designarse como $k_{2g}$ y no como $k_2$.

8. NORMALIZACIÓN RESPECTO A LOS LÍPIDOS A UN CONTENIDO LIPÍDICO DEL 5 % (MÉTODO DE EXPOSICIÓN ACUÁTICA ÚNICAMENTE)

Los resultados de los FBC (cinético y en estado de equilibrio) obtenidos con ensayos de exposición acuática deben consignarse también en relación con un contenido lipídico de los peces de referencia del 5 % en peso húmedo, salvo que pueda justificarse que la sustancia problema no se acumula principalmente en los lípidos (p. ej., algunas sustancias perfluoradas pueden unirse a las proteínas). Los datos de concentración en peces, o el FBC, tienen que convertirse para referirse a un 5 % de contenido lipídico en peso húmedo. Si se utilizan los mismos peces para medir las concentraciones de sustancia y el contenido lipídico en todos los puntos de muestreo, esto requiere que cada concentración medida en los peces se corrija según el contenido lipídico de estos.

$$C_{f,L} = \frac{0{,}05}{L} \cdot C_f \qquad \text{[Ecuación A5.29]}$$

donde

$C_{f,L}$ = concentración normalizada según el contenido lipídico de los peces (mg $kg^{-1}$ peso húmedo)

$L$ = fracción lipídica (en peso húmedo)

$C_f$ = concentración de la sustancia problema en los peces (mg $kg^{-1}$ peso húmedo)

Si no se realizan análisis del contenido lipídico en todos los peces muestreados, se utiliza un valor medio del contenido lipídico para normalizar el FBC. Para el FBC en estado de equilibrio, debe utilizarse el valor medio registrado al final de la fase de absorción en el grupo de tratamiento. Para la normalización de un FBC cinético pueden darse casos en los que se justifique un enfoque diferente, por ejemplo si el contenido lipídico cambia notablemente durante la fase de absorción o de depuración. No obstante, debe utilizarse sistemáticamente de todos modos una dosis alimentaria que reduzca al mínimo los cambios radicales del contenido lipídico.

$$FBF_{KL} = \frac{0.05}{L_n} \cdot FBC_K \qquad \text{[Ecuación A5.30]}$$

donde

$FBC_{KL}$ = FBC cinético normalizado según el contenido lipídico (L $kg^{-1}$)

$L_n$ = fracción lipídica media (en peso húmedo)

$FBC_K$ = FBC cinético (L $kg^{-1}$)

BIBLIOGRAFÍA

(1) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems, Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(2) Capítulo C.20 del presente anexo, Ensayo de reproducción en *Daphnia magna*.

(3) Spacie A. and Hamelink J.L. (1982), Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1: 309-320.

▼**M7**

(4) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

(5) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993), Nonlinear dependence of fish bioconcentration on *n*-octanol/water partition coefficient. SAR QSAR Environ. Res. 1: 29-39.

(6) Kristensen P. (1991), Bioconcentration in fish: comparison of BCF's derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute, Hørsholm, Denmark.

(7) Arnot J.A., Meylan W., Tunkel J., Howard P.H., Mackay D., Bonnell M. and Boethling R.S. (2009), A quantitative structure-activity relationship for predicting metabolic biotransformation rates for organic chemicals in fish. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1168-1177.

(8) OCDE (2011), QSAR Toolbox 2.1. February 2011. Available from: http://www.oecd.org/document/54/0,3746,en_2649_34379_42923638_1_1_1_1,00.html.

(9) Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C. and Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4' tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. T. Am. Fish. Soc. 104: 785-792.

(10) Ernst W. (1985), Accumulation in aquatic organisms, in Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals, Sheeman, P., *et al*., Editors. John Wiley & Sons Ltd, New York, NY, USA: 243-255.

(11) Reilly P.M., Bajramovic R., Blau G.E., Branson D.R. and Sauerhoff M.W. (1977), Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models. Can. J. Chem. Eng. 55: 614-622.

(12) Hawker D.W. and Connell D.W. (1988), Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(13) Konemann H. and van Leeuwen K. (1980), Toxicokinetics in fish: Accumulation and elimination of six chlorobenzenes by guppies. Chemosphere. 9: 3-19.

▼M7

*Apéndice 6*

**SECCIÓN DE ECUACIONES DEL ENSAYO DE EXPOSICIÓN ACUÁTICA: DISEÑO DEL ENSAYO MINIMIZADO**

La justificación de este enfoque consiste en que el factor de bioconcentración puede determinarse en un ensayo completo bien como factor de bioconcentración en estado de equilibrio ($FBC_{SS}$) calculando la relación entre la concentración de la sustancia problema en los tejidos del pez y la concentración de la sustancia problema en el agua, o bien calculando el factor de bioconcentración cinético ($FBC_K$) como la relación entre la constante de la velocidad de absorción $k_1$ y la constante de la velocidad de depuración $k_2$. El $FBC_K$ es válido incluso si no se consigue ninguna concentración en estado de equilibrio de la sustancia durante la absorción, siempre que los procesos de absorción y de depuración sigan aproximadamente una cinética de primer orden.

Si se mide la concentración tisular de la sustancia ($C_{f1}$) en el momento en que termina la exposición ($t_1$) y esta concentración tisular se vuelve a medir ($C_{f2}$) cuando ha pasado cierto tiempo ($t_2$), es posible calcular la constante de la velocidad de depuración ($k_2$) utilizando la ecuación A5.22 del apéndice 5.

La constante de la velocidad de absorción, $k_1$, puede determinarse de forma algebraica utilizando la ecuación A5.23 del apéndice 5 (donde $C_f$ equivale a $C_{f1}$ y $t$ equivale a $t_1$) (1). Así pues, el factor de bioconcentración cinético con el diseño minimizado (designado como $BCF_{Km}$ para distinguirlo de los factores de bioconcentración cinéticos determinados mediante otros métodos):

$$FBC_{Km} = \frac{k_1}{k_2} \qquad \text{[Ecuación A6.1]}$$

Las concentraciones o los resultados deben corregirse según la dilución debida al crecimiento y normalizarse con relación a un contenido lipídico de los peces del 5 %, tal como se describe en el apéndice 5.

El $FBC_{SS}$ minimizado es el FBC calculado al final de la fase de absorción, suponiendo que se ha alcanzado el estado de equilibrio. Esto solo puede suponerse, ya que el número de puntos de muestreo no es suficiente para demostrarlo.

$$\text{FBC }_{ss}\text{FBCss minimizado} = \frac{C_{f\ -minSS}}{C_{w\ -minSS}} \qquad \text{[Ecuación A6.2]}$$

Donde:

$C_{f\text{-}minSS}$ = concentración en los peces en el estado de equilibrio supuesto al final de la absorción ($mg \cdot kg^{-1}$ peso húmedo).

$C_{w\text{-}minSS}$ = concentración en el agua en el estado de equilibrio supuesto al final de la absorción ($mg \cdot l^{-1}$).

BIBLIOGRAFÍA

(1) Springer T.A., Guiney P.D., Krueger H.O. and Jaber M.J. (2008), Assessment of an approach to estimating aquatic bioconcentration factors using reduced sampling. Environ. Toxicol. Chem. 27: 2271-2280.

▼M7

*Apéndice 7*

**SECCIÓN DE ECUACIONES DEL ENSAYO DE EXPOSICIÓN ALIMENTARIA**

1. Ejemplo de cantidades de componentes de un alimento comercial adecuado para peces

2. Ejemplos de técnicas de enriquecimiento alimentario

3. Cálculo de la eficiencia de la asimilación y del factor de biomagnificación

4. Corrección según el contenido lipídico

5. Evaluación de las diferencias entre la concentración a tiempo cero medida ($C_{0,m}$) y la concentración a tiempo cero derivada ($C_{0,d}$)

6. Orientaciones para las sustancias problema de muy rápida depuración

1. EJEMPLO DE CANTIDADES DE COMPONENTES DE UN ALIMENTO COMERCIAL ADECUADO PARA PECES

| Componente principal | Harina de pescado |
|---|---|
| Proteína bruta | ≤ 55,0 % |
| Grasa bruta | ≤ 15,0 % [1] |
| Fibra bruta | ≥ 2,0 % |
| Humedad | ≥ 12 % |
| Cenizas | ≥ 8 % |

[1] Es posible que en algunas regiones solo se puedan obtener alimentos para peces con una concentración lipídica que se quede muy por debajo de este límite máximo. En estos casos, se deben realizar estudios con la concentración lipídica baja del alimento tal como se suministre, y se ha de ajustar la dosis alimentaria de forma adecuada para mantener la salud de los peces. Los lípidos del alimento no deben aumentarse artificialmente mediante la adición de aceite en exceso.

2. EJEMPLOS DE TÉCNICAS DE ENRIQUECIMIENTO ALIMENTARIO

**Aspectos generales**

Deben prepararse alimentos testigo, exactamente de la misma manera que los alimentos enriquecidos, pero sin la sustancia problema.

Para comprobar la concentración del alimento tratado, se toman de él muestras triplicadas con un método adecuado de extracción y se mide la radiactividad o la concentración de la sustancia problema en los extractos. Deben conseguirse unas recuperaciones analíticas elevadas (> 85 %) con escasa variación entre las muestras (las concentraciones de la sustancia en las tres muestras tomadas al inicio del ensayo no deben variar en más del ± 15 % respecto a la media).

Durante el ensayo alimentario, deben tomarse tres muestras del alimento el día 0 y al final de la fase de absorción, para determinar con ellas el contenido de la sustancia problema en el alimento.

**Preparación del alimento de los peces con un material de ensayo líquido (puro)**

Se fija una concentración de ensayo nominal objetivo en el alimento tratado, por ejemplo 500 µg de sustancia problema /g de alimento. La cantidad adecuada (por masa molar o radiactividad específica) de la sustancia problema pura se añade a una masa conocida de alimento para peces en un tarro de vidrio o en el matraz redondo de un evaporador rotatorio. La masa de alimentos para peces debe ser suficiente para la duración de la fase de absorción

▼M7

(teniendo en cuenta la necesidad de ir aumentando las cantidades en cada aporte de alimento debido al crecimiento de los peces). El alimento para peces debe mezclarse con la sustancia problema durante una noche mediante volteo lento (por ejemplo, utilizando un mezclador de bastidor rotatorio o por rotación si se utiliza el matraz redondo de un evaporador rotatorio). El alimento enriquecido debe conservarse en condiciones que preserven la estabilidad de la sustancia problema en la mezcla alimentaria (por ejemplo, refrigeración) hasta el momento de la utilización.

**Preparación del alimento de los peces con un vehículo de aceite de pescado o de maíz**

Las sustancias problema sólidas deben reducirse a polvo fino con un mortero. Las sustancias problema líquidas pueden añadirse directamente al aceite de pescado o maíz. La sustancia problema se disuelve en una cantidad determinada de aceite de pescado o maíz (por ejemplo, 5-15 ml). El aceite enriquecido se transfiere cuantitativamente al matraz redondo de un evaporador rotatorio de tamaño adecuado. El recipiente utilizado para preparar el aceite enriquecido debe lavarse con dos pequeñas alícuotas de aceite, que se añaden al matraz redondo para garantizar que se transfiere toda la sustancia problema disuelta. Para garantizar la completa disolución o dispersión en el aceite (o si se utiliza en el estudio más de una sustancia problema), se añade un micro-agitador, se tapa el matraz y se agita la mezcla deprisa durante una noche. Para el ensayo se añade al matraz redondo una cantidad apropiada de alimento de los peces (normalmente en forma de granulado) y el contenido del matraz redondo se mezcla a fondo volteándolo continuamente durante al menos 30 minutos, pero preferentemente durante toda una noche. A continuación, el alimento enriquecido se almacena adecuadamente (por ejemplo, refrigerado) para garantizar la estabilidad de la sustancia problema en el alimento hasta su utilización.

**Preparación del alimento de los peces con un disolvente orgánico**

La cantidad apropiada de sustancia problema (por masa molar o radiactividad específica) suficiente para alcanzar la dosis objetivo se disuelve en un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, ciclohexano o acetona; 10-40 ml, pero puede ser necesario un volumen mayor en función de la cantidad de alimento por enriquecer). Una parte alícuota de esta solución o toda ella (añadida por partes) se mezcla con la masa adecuada de alimento de peces suficiente para que el ensayo alcance el nivel necesario de dosis nominal. El alimento y la sustancia problema pueden mezclarse en una mezcladora de acero inoxidable y el alimento recién enriquecido puede dejarse en la mezcladora, en una campana de laboratorio, durante dos días (agitando de vez en cuando) para permitir que se evapore el disolvente en exceso, o mezclarse en el matraz redondo de un evaporador rotatorio de rotación continua. El exceso de disolvente puede eliminarse arrastrándolo con una corriente de aire o de nitrógeno en caso necesario. Debe velarse por que la sustancia problema no cristalice al eliminar el disolvente. El alimento enriquecido debe conservarse en condiciones (por ejemplo, refrigeración) que preserven la estabilidad de la sustancia problema en la mezcla alimentaria hasta el momento de la utilización.

3. CÁLCULO DE LA EFICIENCIA DE LA ASIMILACIÓN Y DEL FACTOR DE BIOMAGNIFICACIÓN

Para calcular la eficiencia de la asimilación, debe estimarse primero la constante de la velocidad de depuración general con arreglo a la sección 4 del apéndice 5 (siguiendo el método secuencial, es decir, una regresión lineal normal) y utilizando las concentraciones medias de las muestras de la fase de depuración. La dosis alimentaria, $I$, y la duración de la absorción, $t$, son parámetros conocidos del estudio. $C_{\text{food}}$, la concentración medida media de la sustancia problema en los alimentos es una variable medida en el estudio. $C_{0,\text{d}}$, la concentración de la sustancia problema en los peces al final de la fase de absorción, se obtiene generalmente de la ordenada en el origen de la gráfica de ln (concentración) frente a los días de depuración.

La eficiencia de la asimilación de la sustancia (a, absorción de la sustancia problema en el intestino) se calcula de la siguiente manera:

$$\alpha = \frac{C_{0,d} \cdot k_2}{I \cdot C_{food}} \cdot \frac{1}{1 - e^{-k_2 t}} \qquad \text{[Ecuación A7.1]}$$

donde:

$C_{0,d}$ = concentración en los peces derivada en el tiempo cero de la fase de depuración (mg $kg^{-1}$);

▼M7

$k_2$ = constante de la velocidad de depuración general (sin corregir según el crecimiento) (día$^{-1}$), calculada según las ecuaciones del apéndice 5, sección 3;

$I$ = velocidad de ingestión de alimento (g alimento g$^{-1}$ peces día$^{-1}$);

$C_{food}$ = concentración en el alimento (mg kg$^{-1}$ alimento);

$t$ = duración del periodo de alimentación (días)

No obstante, es posible que sea necesario ajustar la dosis alimentaria, $I$, utilizada en el cálculo para tener en cuenta el crecimiento de los peces, a fin de obtener una eficiencia de asimilación exacta, a. En un ensayo en el que los peces crezcan de manera significativa durante la fase de absorción (sin que se haga ninguna corrección de las cantidades de alimento para mantener la dosis alimentaria fijada), la tasa alimentaria efectiva, a medida que avanza la fase de absorción, será inferior a la fijada, lo que resulta en una mayor eficiencia de asimilación «real». (Obsérvese que esto no es importante para el cálculo general del FBM, ya que los términos de $I$ se anulan efectivamente entre la ecuación A7.1 y la ecuación A7.4). La dosis alimentaria media corregida según la dilución debida al crecimiento, $I_g$, puede obtenerse de diversas formas, de las que una directa y rigurosa es utilizar la constante de la velocidad de crecimiento conocida ($k_g$) para estimar los pesos de los peces del ensayo a diversos tiempos de la fase de absorción, es decir:

$$W_f(t) = W_{f,0} \times e^{k_g \cdot t} \qquad \text{[Ecuación A7.2]}$$

donde

$W_f$ ($t$) = peso medio de los peces el día $t$ de la fase de absorción

$W_{f,0}$ = peso medio de los peces al inicio del experimento

De esta manera puede estimarse (al menos) el peso medio de los peces del último día de exposición ($W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}$). Como la dosis alimentaria se fija sobre la base del $W_{f,0}$, la dosis alimentaria efectiva de cada día de la fase de absorción puede calcularse utilizando estos dos valores del peso. La dosis alimentaria corregida según el crecimiento, $I_g$ (g alimento g$^{-1}$ pez día$^{-1}$), que debe utilizarse en lugar de $I$ en caso de crecimiento rápido durante la fase de absorción, puede calcularse entonces de la manera siguiente:

$$I_g = \frac{I \times W_{f,0}}{W_{f,end\text{-}of\text{-}uptake}} \qquad \text{[Ecuación A7.3]}$$

Una vez obtenida la eficiencia de la asimilación, puede calcularse el FBM multiplicándola por la dosis alimentaria $I$ (o $I_g$, si se utiliza esta para calcular α) y dividiendo el resultado por la constante de la velocidad de depuración general $k_2$:

$$FBM = \frac{I \times \alpha}{k_2} \qquad \text{[Ecuación A7.4]}$$

El factor de biomagnificación corregido según el crecimiento debe calcularse también de la misma forma, utilizando la constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento (obtenida con arreglo a la sección 7 del apéndice 5). De nuevo, si se ha utilizado $I_g$ para calcular α, debe utilizarse también aquí en lugar de $I$:

$$FBM = \frac{I \times \alpha}{k_{2g}} \qquad \text{[Ecuación A7.5]}$$

donde:

$\alpha$ = eficiencia de la asimilación (absorción de la sustancia problema en el intestino);

$k_2$ = constante de la velocidad de depuración general (sin corregir según el crecimiento) (día$^{-1}$), calculada según las ecuaciones del apéndice 5, sección 3;

▼M7

$k_{2g}$ = constante de la velocidad de depuración corregida según el crecimiento (día$^{-1}$);

$I$ = velocidad de ingestión de alimento (g alimento g$^{-1}$ peces día$^{-1}$);

La semivida ($t_{1/2}$) corregida según el crecimiento se calcula de la forma siguiente:

$$t_{1/2} = \frac{0{,}693}{k_{2g}} \qquad \text{[Ecuación A7.6]}$$

La eficiencia de la asimilación de la sustancia desde el alimento también puede estimarse si se determinan los residuos en los tejidos durante la fase lineal de la absorción (entre los días 1 y 3). En este caso la eficiencia de la asimilación de la sustancia (α) puede determinarse como sigue:

$$\alpha = \frac{C_{fish}(t)}{I \times C_{food} \times t} \qquad \text{[Ecuación A7.7]}$$

Donde:

$C_{fish}(t)$ = concentración de la sustancia problema en los peces al tiempo $t$ (mg kg$^{-1}$ peso húmedo).

4. CORRECCIÓN SEGÚN EL CONTENIDO LIPÍDICO

Si el contenido lipídico se mide en los mismos peces en que se hacen los análisis del producto en todos los intervalos de muestreo, deben corregirse las concentraciones individuales según el contenido lipídico y hay que representar gráficamente el ln (concentración corregida según el contenido lipídico) frente al tiempo de depuración (días) para obtener $C_{0,d}$ y $k_2$. A continuación puede calcularse la eficiencia de la asimilación (ecuación A7.1) según el contenido lipídico, utilizando $C_{food}$ según el contenido lipídico (es decir, $C_{food}$ se multiplica por la fracción lipídica media del alimento). Un cálculo utilizando las ecuaciones A7.4 y A7.5 permite entonces obtener directamente el FBM corregido según el contenido lipídico (y según la dilución debida al crecimiento).

En caso contrario, la fracción lipídica media (p/p) de los peces y la de los alimentos se derivan tanto respecto a los grupos de tratamiento y a los testigos (para los alimentos y los peces de los grupos testigos suele hacerse a partir de datos medidos al inicio y al final de la exposición; para los peces de los grupos de tratamiento suele hacerse a partir de datos medidos al final de la exposición solo). En algunos estudios puede aumentar notablemente el contenido lipídico de los peces; en tales casos, es más adecuado utilizar una concentración lipídica media de los peces de ensayo calculada a partir de los valores medidos al final de la exposición y al final de la depuración. En general, los datos de los grupos de tratamiento solo deben utilizarse para derivar las dos fracciones lipídicas.

El factor de corrección según el contenido lipídico ($L_c$) se calcula del siguiente modo:

$$L_C = \frac{L_{fish}}{L_{food}} \qquad \text{[Ecuación A7.8]}$$

donde $L_{fish}$ y $L_{food}$ son las fracciones lipídicas medias de los peces y de los alimentos, respectivamente.

El factor de corrección según el contenido lipídico se utiliza para calcular el factor de biomagnificación corregido según el contenido lipídico ($FBM_L$):

$$FBM_L = \frac{FBM}{L_C} \qquad \text{[Ecuación A7.9]}$$

5. EVALUACIÓN DE LAS DIFERENCIAS ENTRE LA CONCENTRACIÓN A TIEMPO CERO MEDIDA ($C_{0,M}$) Y LA CONCENTRACIÓN A TIEMPO CERO DERIVADA ($C_{0,D}$)

Deben compararse la concentración a tiempo cero medida ($C_{0,m}$) y la concentración a tiempo cero derivada ($C_{0,d}$). Si son muy similares, se confirma el modelo de primer orden utilizado para determinar los parámetros de depuración.

▼M7

En algunos estudios puede haber una marcada diferencia entre el valor a tiempo cero derivado, $C_{0,d}$, y la concentración a tiempo cero medida media. $C_{0,m}$ (véase el último inciso del punto 159 del presente método de ensayo). Si $C_{0,d}$ es mucho menor que $C_{0,m}$ ($C_{0,d} << C_{0,m}$), la diferencia puede sugerir la presencia en el intestino de alimento enriquecido sin digerir. Esto puede comprobarse de manera experimental mediante la realización de análisis aparte con el intestino extirpado si se han tomado y conservado muestras adicionales (peces enteros) al final de la fase de absorción. En caso contrario, si una prueba estadísticamente válida de resultados discrepantes se aplica a la regresión lineal de la fase de depuración e indica que la concentración del primer punto de muestreo de la depuración es erróneamente elevada, puede ser adecuado efectuar la regresión lineal para calcular $k_2$, pero omitiendo el primer punto de concentración de la depuración. En estos casos, si la incertidumbre de la regresión lineal disminuye en gran medida, y es evidente que se cumple una cinética de depuración aproximadamente de primer orden, puede ser conveniente utilizar los valores resultantes de $C_{0,d}$ y $k_2$ en el cálculo de la eficiencia de la asimilación. Esto debe justificarse plenamente en el informe. También es posible que en la fase de depuración rija una cinética distinta de la de primer orden. Si esto resulta probable (es decir, si la gráfica de los logaritmos naturales de los datos sigue un trazado en curva en comparación con la línea recta de la gráfica de regresión lineal), no es fácil que resulten válidos los cálculos de $k_2$ y $C_{0,d}$, y debe buscarse el consejo de un bioestadístico.

Si $C_{0,d}$ es mucho más elevado que el valor medido ($C_{0,d} >> C_{0,m}$), esto puede indicar: que la sustancia se depura muy rápidamente (es decir, los puntos de muestreo se acercan al límite de cuantificación del método analítico muy pronto en la fase de depuración, véase la sección 6 a continuación); que hay desviación respecto a una cinética de depuración de primer orden; que la regresión lineal para calcular $k_2$ y $C_{0,d}$ es deficiente; o que se ha producido en algunos tiempos de muestreo un problema con las concentraciones medidas en el estudio. En esos casos, debe examinarse la gráfica de la regresión lineal para buscar indicios de muestras en el límite de cuantificación o cerca de este, o de valores anómalos y curvaturas evidentes (sugerentes de que la cinética no es de primer orden), lo cual debe destacarse en el informe. Debe describirse y justificarse la eventual reevaluación posterior de la regresión lineal para mejorar los valores estimados. Si se observa una desviación marcada respecto a la cinética de primer orden, resulta poco probable que sean válidos los cálculos de $k_2$ y $C_{0,d}$, y debe pedirse consejo a un bioestadístico.

6. ORIENTACIONES PARA LAS SUSTANCIAS PROBLEMA DE MUY RÁPIDA DEPURACIÓN

Como se comentaba en el punto 129 del método de ensayo, algunas sustancias pueden depurarse tan deprisa que no puede derivarse una concentración a tiempo cero, $C_{0,d}$, ni una $k_2$ fiables porque ya muy al inicio de la fase de depuración (es decir, a partir de la segunda muestra de esta fase) la sustancia ya no puede medirse efectivamente (concentraciones indicadas al límite de cuantificación). Esta situación se ha observado en el ensayo interlaboratorios realizado en apoyo del presente método de ensayo con benzo[a]pireno, y se ha documentado en el informe de validación del método. En esos casos, no puede realizarse una regresión lineal de manera fiable, y es probable que se dé una estimación exageradamente elevada de $C_{0,d}$, con el resultado de una eficiencia de asimilación aparente muy superior a 1. En estas circunstancias es posible calcular una estimación prudente de $k_2$ y un «límite superior» del FBM.

Utilizando estos puntos de datos de la fase de depuración en los que se mide la concentración, hasta la primera concentración «no detectada» (concentración fijada al límite de cuantificación) inclusive, puede conseguirse una estimación de $k_2$ mediante una regresión lineal (utilizando la representación del logaritmo natural de los datos de concentración frente al tiempo). Para este tipo de casos es probable que solo se tengan en cuenta dos puntos de datos (por ejemplo, en los días de muestreo 1 y 2 de la depuración) y entonces puede estimarse $k_2$ utilizando la ecuación A5.22 del apéndice 5. Esta estimación de $k_2$ puede utilizarse para estimar la eficiencia de la asimilación con arreglo a la ecuación A7.1, sustituyendo el valor de $C_{0,d}$ en la

▼M7

ecuación por la concentración al tiempo cero medida ($C_{0,m}$) en los casos en que se estima claramente que $C_{0,d}$ es mucho mayor de lo que habría podido alcanzarse en el ensayo. Si $C_{0,m}$ no es mensurable, debe utilizarse el límite de detección en los tejidos de los peces. Si, en algunos casos, ello arroja un valor de $\alpha > 1$, se supone que la eficiencia de asimilación es igual a 1 en el «peor de los casos».

Entonces puede estimarse el $FBM_K$ máximo utilizando la ecuación A7.4, y debe indicarse como valor «muy inferior a» (<<). Por ejemplo, si se trata de un estudio llevado a cabo con una dosis alimentaria del 3 % y una semivida de depuración inferior a 3 días, y una α en el «peor de los casos» igual a 1, es probable que el $FBM_K$ sea inferior a aproximadamente 0,13. Habida cuenta de la finalidad de esta estimación y del hecho de que los valores son de naturaleza prudente, no es necesario corregirlos según la dilución debida al crecimiento ni según el contenido lipídico de los peces y los alimentos.

▼M7

*Apéndice 8*

**ENFOQUES PARA LA ESTIMACIÓN PROVISIONAL DE LOS FBC A PARTIR DE DATOS RECOGIDOS EN EL ESTUDIO DE EXPOSICIÓN ALIMENTARIA**

El método alimentario se incluye aquí para el ensayo de bioacumulación de sustancias que en la práctica no pueden someterse a ensayo utilizando el método de exposición acuática. El método de exposición acuática da un factor de bioconcentración, mientras que el método alimentario proporciona directamente información sobre el potencial de biomagnificación por la alimentación. En muchos regímenes de seguridad de los productos químicos se requiere información sobre la bioconcentración acuática (por ejemplo, en la evaluación del riesgo y en el Sistema Globalmente Armonizado de clasificación). Por tanto, es preciso recurrir a los datos obtenidos en un estudio alimentario para estimar un factor de bioconcentración que sea comparable al de los ensayos realizados de conformidad con el método de exposición acuática ([1]). En esta sección se presentan los enfoques que pueden seguirse para ello, reconociendo a la vez las deficiencias inherentes a las estimaciones.

El estudio alimentario mide la depuración para dar una constante de la velocidad de depuración, $k_2$. Si se puede calcular una constante de la velocidad de absorción con los datos disponibles para la situación en que los peces se exponen a la sustancia problema a través del agua, entonces podría estimarse un FBC cinético.

La estimación de una constante de la velocidad de absorción en caso de exposición acuática a una sustancia problema depende de muchas hipótesis, todas las cuales contribuirán a la incertidumbre de la estimación. Por otra parte, este enfoque para estimar un FBC supone que la velocidad general de depuración (incluidos los factores correspondientes, como la distribución en el organismo y los distintos procesos de depuración) es independiente de la técnica de exposición utilizada para producir una carga corporal de la sustancia problema.

Las principales hipótesis inherentes al enfoque de la estimación pueden resumirse de la siguiente manera.

La depuración tras la absorción alimentaria es la misma que la depuración tras la exposición acuática con una sustancia dada.

La absorción desde el agua sigue una cinética de primer orden.

Dependiendo del método utilizado para la estimación de la absorción:

— la absorción puede estar correlacionada solo con el peso de los peces

— la absorción puede estar correlacionada solo con el coeficiente de reparto octanol/agua de la sustancia

— la absorción puede estar correlacionada con una combinación del peso de los peces y del coeficiente de reparto octanol/agua de la sustancia

— los factores que pueden afectar a la absorción en un estudio de exposición acuática en la práctica, como la biodisponibilidad de la sustancia, la adsorción a los aparatos, el tamaño molecular, etc., tienen poco efecto

— y, con carácter fundamental:

la base de datos («conjunto de formación») utilizada para elaborar el método de estimación de la absorción es representativa de la sustancia de que se trate.

Varias publicaciones en la bibliografía de acceso libre proporcionan ecuaciones en las que la absorción en los peces desde el agua a través de las branquias se relaciona con las siguientes propiedades: coeficiente de reparto octanol/agua de la sustancia, peso de los peces (1) (2) (3) (4), volumen y/o contenido lipídico, difusión/ permeabilidad por membrana (5) (6), volumen de ventilación de los peces (7), y mediante un enfoque de fugacidad/balance de masas (8) (9) (10). En Crookes & Brooke (11) se da una evaluación detallada de tales métodos en este

([1]) En la naturaleza, es probable que la ruta que conduzca a la mayor exposición en entornos acuáticos sea a través de la ingestión de sustancias muy hidrófobas, por lo que el FBC estimado no es estrictamente representativo del potencial de bioacumulación de tales sustancias.

▼M7

contexto. También es útil aquí una publicación de Barber (12) centrada en la modelización de la bioacumulación mediante la absorción alimentaria, puesto que incluye contribuciones de los modelos de la velocidad de absorción por las branquias. También se dedicaba a este aspecto una sección del documento de base del protocolo alimentario de 2004 (13).

Parece que la mayoría de estos modelos se ha elaborado utilizando bases de datos limitadas. Para los modelos en los que se dispone de los detalles de la base de datos utilizada para construirlos, parece que los tipos de sustancias utilizadas son a menudo de estructura o clase similar (en términos de funcionalidad, por ejemplo compuestos organoclorados). Esto contribuye a la incertidumbre de utilizar un modelo para predecir la constante de la velocidad de absorción para un tipo diferente de sustancia, además de las consideraciones específicas del ensayo, como la especie, la temperatura, etc.

Una revisión de las técnicas disponibles (11) destacaba que no hay un método «más correcto» que los otros. Por lo tanto, debe darse una justificación clara del modelo utilizado. En caso de que se disponga de varios métodos cuyo uso se pueda justificar, parece prudente presentar varias estimaciones de $k_1$ (y también del FBC) o un intervalo de valores de $k_1$ (y del FBC) con arreglo a varios métodos de estimación de la absorción. Sin embargo, habida cuenta de las diferencias existentes en los tipos de modelo y en los conjuntos de datos usados para elaborarlos, puede que no sea apropiado tomar un valor medio a partir de estimaciones obtenidas de distintas maneras.

Algunos investigadores han planteado que las estimaciones del FBC de este tipo requieren una corrección según la biodisponibilidad para tener en cuenta la adsorción de la sustancia al carbono orgánico disuelto (COD) en condiciones de exposición acuática, para situar la estimación en consonancia con los resultados de los estudios de exposición acuática (p. ej., (13) (14)). No obstante, puede que esta corrección no sea adecuada, habida cuenta de los bajos niveles de COD requeridos en un estudio de exposición acuática para hacer una estimación en el «peor de los casos» (es decir, la proporción de sustancia biodisponible respecto a la sustancia medida en la solución). En el caso de las sustancias muy hidrófobas, la absorción en las branquias puede verse limitada por la velocidad de difusión pasiva cerca de la superficie de las branquias; en este caso, es posible que la corrección tenga en cuenta tal efecto, en lugar de aquel para el que se había concebido.

Se recomienda centrarse en los métodos que requieren aportaciones para las que se puede disponer fácilmente de datos sobre las sustancias sometidas a ensayo según el estudio alimentario aquí descrito (es decir, log $K_{OW}$, peso de los peces). Puede aplicarse otros métodos que requieran aportaciones más complejas, pero pueden exigir otras mediciones en el ensayo o un conocimiento detallado de la sustancia problema o de la especie de peces que pueden ser difíciles de obtener. Además, la elección del modelo puede verse influida por el nivel de la validación y el ámbito de aplicabilidad (véase en (11) una revisión y una comparación de métodos diferentes).

Debe tenerse en cuenta que la estimación resultante de $k_1$, y el FBC estimado, son inciertos y puede ser necesario tratarlos según un enfoque de ponderación de las pruebas junto con el FBM derivado y los parámetros de la sustancia (por ejemplo, el tamaño molecular) para conseguir una visión global del potencial de bioacumulación de la sustancia. La interpretación y utilización de estos parámetros puede depender del marco normativo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Sijm D.T.H.M., Pärt P. and Opperhuizen A. (1993), The influence of temperature on the uptake rate constants of hydrophobic compounds determined by the isolated perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 25: 1-14.

(2) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., Part P. and Opperhuizen A. (1994), Experimentally determined blood and water flow limitations for uptake of hydrophobic compounds using perfused gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Allometric applications. Aquat. Toxicol. 30: 325-341.

(3) Sijm D.T.H.M., Verberne M.E., de Jonge W.J., Pärt P. and Opperhuizen A. (1995), Allometry in the uptake of hydrophobic chemicals determined *in vivo* and in isolated perfused gills. Toxicol. Appl. Pharmacol. 131: 130-135.

▼M7

(4) Barber M.C. (2003), A review and comparison of models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. Environ. Toxicol. Chem. 22: 1963-1992.

(5) Opperhuizen A. (1986), Bioconcentration of hydrophobic chemicals in fish, in Aquatic Toxicology and Environmental Fate, STP 921, Poston, T.M. and Purdy, R., Editors. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA: 304-315.

(6) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2004), A food web bioaccumulation model for organic chemicals in aquatic ecosystems. Environ. Toxicol. Chem. 23: 2343-2355.

(7) Thomann R.V. (1989), Bioaccumulation model of organic chemical distribution in aquatic food chains. Environ. Sci. Technol. 23: 699-707.

(8) Hendriks A.J., van der Linde A., Cornelissen G. and Sijm D.T.H.M. (2001). The power of size. 1. Rate constants and equilibrium ratios for accumulation of organic substances related to octanol-water partition ratio and species weight. Environ. Toxicol. Chem. 20: 1399-1420.

(9) Campfens J. and Mackay D. (1997), Fugacity-based model of PCB bioaccumulation in complex aquatic food webs. Environ. Sci. Technol. 31: 577-583.

(10) Arnot J.A. and Gobas F.A.P.C. (2003), A generic QSAR for assessing the bioaccumulation potential of organic chemicals in aquatic food webs. QSAR Comb. Sci. 22: 337-345.

(11) Crookes M. and Brooke D. (2010), Estimation of fish bioconcentration factor (BCF) from depuration data. Draft Report. Environmental Agency, Bristol, UK.

(12) Barber M.C. (2008), Dietary uptake models used for modelling the bioaccumulation of organic contaminants in fish. Environ. Toxicol. Chem. 27: 755-777

(13) Anónimo (2004), Background document to the fish dietary study protocol, document submitted to the TC-NES WG on PBT.

(14) Gobas F. and Morrison H. (2000), Bioconcentration and biomagnification in the aquatic environment, in Handbook of property estimation methods for chemicals, Boethling, R.S. and Mackay, D., Editors. Lewis Publishers, Boca Racton, FL, USA: 189-231..

▼B

C.14. **ENSAYO DE CRECIMIENTO EN PECES JUVENILES**

1. **MÉTODO**

El presente método de ensayo de toxicidad para el crecimiento reproduce las directrices del documento OCDE TG 215 (2000).

1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo tiene por objeto determinar los efectos de la exposición prolongada a sustancias químicas sobre el crecimiento de peces juveniles y se funda en un método elaborado y sometido a un estudio interlaboratorios (1) (3) en la Unión Europea para valorar los efectos de las sustancias químicas en el crecimiento de juveniles de trucha arco iris *(Oncorhynchus mykiss)* en condiciones dinámicas. Pueden emplearse otras especies de peces bien estudiadas. Por ejemplo, se dispone de una cierta experiencia en ensayos de crecimiento con el pez cebra *(Danio rerio)* (2) (4) (5) y el medaka *(Oryzias (atipes)* (6) (7) (8).

Véase también la parte C de la introducción general.

1.2. DEFINICIONES

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC):** concentración más baja de sustancia de ensayo con la que se observa un efecto significativo (para $p < 0,05$) en comparación con el control. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC han de provocar un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración.

**Concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC):** concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC.

$EC_X$: en el presente método de ensayo, concentración de sustancia de ensayo que produce una variación del x % en la tasa de crecimiento de los peces respecto a los controles.

**Tasa de carga:** peso húmedo de peces por unidad de volumen de agua.

**Densidad de población:** número de peces por unidad de volumen de agua.

**Tasa de crecimiento específico de cada pez:** tasa de crecimiento de un pez respecto a su peso inicial.

**Tasa de crecimiento específico medio por recipiente:** tasa de crecimiento medio de la población de un recipiente a una concentración determinada.

**Tasa de crecimiento pseudoespecífico:** tasa de crecimiento individual respecto al peso inicial medio de la población del recipiente.

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Después de haberlos pesado, se colocan peces juveniles en fase de crecimiento exponencial en recipientes de ensayo y se exponen a una gama de concentraciones subletales de la sustancia de ensayo disuelta en agua, preferiblemente en condiciones dinámicas (flujo continuo) o, de no ser posible, en condiciones semiestáticas adecuadas (renovación discontinua). La duración del ensayo es de 28 días. Se proporciona alimento a los peces todos los días. La ración alimentaria se determina en función del peso inicial de los peces y puede volverse a calcular transcurridos 14 días. Al final del ensayo, se vuelven a pesar los peces. Se analizan los efectos sobre la tasa de crecimiento mediante un modelo de regresión con el fin de estimar la concentración que produciría una variación del x % de dicha tasa, es decir, $EC_x$ ($EC_{10}$, $EC_{20}$ o $EC_{30}$, por ejemplo). También pueden compararse los datos con los valores de los controles para determinar la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y. de ahí, la concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC).

1.4. INFORMACIÓN RELATIVA A LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Debe disponerse de los resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase el método C.1) efectuado preferiblemente con la especie objeto del presente ensayo y conocerse la solubilidad en el agua y la presión de vapor de la sustancia de ensayo. Para calcular la cantidad de sustancia en las soluciones de ensayo debe aplicarse un método analítico fiable, cuyo limite de detección y precisión sean conocidos y figuren en el informe.

La información útil para establecer las condiciones de ensayo incluye la fórmula estructural de la sustancia de ensayo, su pureza, estabilidad en el agua y a la luz, $pK_a$, $P_{ow}$ y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

1.5. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la mortalidad en los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo,

— el peso medio de los peces de los controles debe haber aumentado lo suficiente para poder detectar la variación mínima de la tasa de crecimiento que se considere significativa. Un ensayo interlaboratorios (3) ha puesto de manifiesto que, en el caso de la trucha arco iris, al cabo de 28 días el peso medio de los peces de los controles ha de haberse incrementado al menos en la mitad (50 %) de su peso medio inicial. Por ejemplo, si el peso inicial es de 1 g/pez (= 100 %), el peso final tras 28 días ha de ser ≥1,5 g/pez (≥ 150 %),

— la concentración de oxígeno disuelto ha de ser, al menos, del 60 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el ensayo,

— en ningún momento del ensayo la temperatura del agua debe variar en más de ± 1 °C entre los recipientes de ensayo y debe mantenerse en un intervalo de 2 °C dentro de las gamas establecidas para la especie sometida a ensayo (apéndice 1).

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Equipo**

Se empleará el equipo común de laboratorio y, en particular:

a) medidores de oxígeno y de pH;

▼B

b) equipo para determinar la dureza y alcalinidad del agua:

c) dispositivo adecuado de regulación de la temperatura, preferiblemente continua:

d) recipientes de material químicamente inerte y de capacidad adecuada a la carga y la densidad de población recomendadas (véase el punto 1.8.5 y el apéndice 1);

e) balanza suficientemente precisa (precisión de ± 0,5 %).

1.6.2. **Agua**

Puede utilizarse para el ensayo toda agua en la que la especie sometida a ensayo muestre una tasa de crecimiento y supervivencia a largo plazo adecuadas. La calidad ha de ser constante a todo lo largo del ensayo. El pH debe hallarse entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de ± 0,5 pH unidades. Se recomienda una dureza superior a 140 mg/l ($CaCO_3$). Deben tomarse periódicamente muestras para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo). Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, conviene proceder, por ejemplo, cada tres meses, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd y Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl y $SO_4$), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, los análisis pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada seis meses). En el apéndice 2 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable.

1.6.3. **Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de la solución madre.

La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación mecánica de la sustancia de ensayo en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad para lograr la concentración adecuada de solución madre.

En algunos casos puede ser necesario usar disolventes o dispersantes (agentes de disolución) para obtener una solución madre a la concentración deseada. Puede entonces utilizarse como disolvente acetona, etanol, meta-nol. dimetilsulfóxido, dimetilformamida o trietílenglicol, y como dispersante Cremophor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % o HCO-40. Deben tomarse precauciones si se emplean agentes fácilmente biodegrada-bles (como la acetona) y/o muy volátiles, pues estos pueden dar lugar a una proliferación bacteriana en los ensayos dinámicos. Si se emplea un agente de disolución, no debe actuar de forma significativa sobre el crecimiento de los peces ni producir efectos nocivos visibles en los juveniles, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo contenga disolvente.

▼B

Para los ensayos dinámicos se requiere un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad, preferiblemente todos los días, y no debería variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Con arreglo a un ensayo interlaboratorios (3), en el caso de la trucha arco iris se considera adecuado un régimen de renovación del agua durante el ensayo equivalente a 6 l/g de pez/día (véase el punto 1.8.2.2).

En el caso de los ensayos semiestáticos, la frecuencia de renovación del medio dependerá de la estabilidad de la sustancia de ensayo, si bien se recomienda renovarlo todos los días. Si los ensayos preliminares de estabilidad (véase el punto 1.4) ponen de manifiesto que la concentración de la sustancia de ensayo no es estable (es decir, queda fuera del intervalo del 80 al 120 % de la concentración nominal o cae por debajo del 80 % de la concentración medida al inicio) entre dos renovaciones, debe plantearse la realización de un ensayo dinámico.

1.6.4. **Selección de la especie**

Se recomienda realizar el ensayo con la trucha arco iris *(Oncorhynchus mykiss),* pues es la especie que más se ha empleado en el ensayo interlaboratorios (1) (3). También es posible emplear otras especies bien estudiadas, aunque entonces podría ser necesario adaptar el procedimiento para que las condiciones de ensayo sean adecuadas. Por ejemplo, se dispone asimismo de experiencia con el pez cebra *(Danio rerio)* (4) (5) y el medaka *(Oryzias latipes)* (6) (7) (8). En tal caso, deben justificarse la elección de la especie y el método experimental.

1.6.5. **Preparación de los peces**

Se seleccionan los peces de ensayo de una misma población, y preferentemente de un mismo desove, que se haya mantenido al menos dos semanas antes del ensayo en condiciones de calidad del agua e iluminación similares a las del ensayo. Debe proporcionárseles una ración alimentaria diaria del 2 % de su peso corporal como mínimo y preferiblemente del 4 % mientras duren la preparación y el ensayo.

Transcurridas 48 horas en esas condiciones, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

— si la mortalidad es superior al 10 % de la población en siete días, se rechaza todo el lote,

— si la mortalidad se halla entre el 5 y el 10 % de la población, se prolonga otros siete días el período de aclimatación; si durante este segundo período la mortalidad supera el 5 %, se rechaza todo el lote,

— si la mortalidad es inferior al 5 % de la población en siete días, se acepta el lote.

Los peces no deben recibir tratamiento terapéutico alguno durante el ensayo ni en las dos semanas anteriores al mismo.

▼B

1.7. DISEÑO DEL ENSAYO

Se entenderá por «diseño del ensayo» la selección del número de concentraciones de ensayo y el intervalo entre las mismas, el número de recipientes por concentración y el número de peces por recipiente. Lo más idóneo es diseñar el ensayo con arreglo a:

a) el objetivo del estudio;

b) el método de análisis estadístico que vaya a emplearse;

c) la disponibilidad y el coste de los recursos experimentales.

En la medida de lo posible, el enunciado del objetivo debe especificar la potencia estadística necesaria para detectar una diferencia determinada (por ejemplo, de tasa de crecimiento) o la precisión con la que ha de proporcionarse la $EC_x$ (por ejemplo, x — 10, 20 o 30 y preferiblemente no por debajo de 10) para poder hacer una estimación. Sin ello no puede darse una, indicación precisa de la escala del estudio.

Es importante ser consciente de que un diseño idóneo (que saca mayor partido de los recursos) para un método de análisis estadístico no lo es necesariamente para otro. Así pues, el diseño recomendado para la estimación de una LOEC/NOEC no será el mismo que se recomiende para un análisis por regresión.

En la mayoría de los casos, es preferible el análisis de regresión al análisis de la varianza, por los motivos que exponen Stephan y Rogers (9). Sin embargo, si no se encuentra un modelo de regresión adecuado ($r^2 < 0,9$), debe recurrirse a la NOEC/LOEC.

1.7.1. **Diseño para el análisis por regresión**

Los aspectos importantes para el diseño de un ensayo que vaya a analizarse por regresión son los siguientes:

a) Es conveniente que las concentraciones empleadas incluyan la concentración con efecto ($EC_{1O,2O,3O}$, etc.) y la gama de concentraciones en la sustancia de ensayo. La precisión con la que puede estimarse la concentración con efecto será mayor si dicha concentración se halla en el medio de la gama de concentraciones empleada en el ensayo. Para seleccionar las concentraciones de ensayo adecuadas puede resultar útil un ensayo previo de determinación de gama;

b) para que la modelización estadística sea satisfactoria, el ensayo debe incluir al menos un recipiente de control y otros cinco recipientes con distintas concentraciones. En su caso, si se emplea un agente de disolución, debe realizarse, además de las series tratadas con la sustancia de ensayo, un control con agente de disolución a la concentración de ensayo más elevada (véanse los puntos 1.8.3 y 1.8.4);

c) puede emplearse una serie geométrica o logarítmica apropiada (10) (véase el apéndice 3). Es preferible un espaciamiento logarítmico entre las concentraciones de ensayo;

▼B

d) si se dispone de más de seis recipientes, los que sobrepasen dicha cantidad se emplearán como recipientes en paralelo o se distribuirán en la gama de concentraciones para reducir el espaciamiento entre estas.Ambas opciones son igualmente válidas.

1.7.2. **Diseño para la estimación de la NOEC/LOEC mediante análisis de la varianza (ANOVA)**

Conviene disponer de varios recipientes en paralelo para cada concentración y realizar el análisis estadístico por recipiente (11). Sin recipientes en paralelo no puede tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes además de la que existe entre los peces. No obstante, la experiencia ha puesto de manifiesto (12) que en el caso estudiado la variabilidad entre recipientes era muy escasa en relación con la variabilidad dentro de un mismo recipiente (es decir, entre los peces). Así pues, una opción relativamente aceptable consiste en efectuar el análisis estadístico a escala individual con cada pez.

Normalmente se emplea una serie geométrica de al menos cinco concentraciones de sustancia de ensayo, espaciadas por un factor que no supere 3,2.

Por lo general, si se realizan ensayos con recipientes en paralelo, el número de recipientes de control en paralelo y, por tanto, el número de peces ha de ser el doble del empleado con cada concentración de ensayo, que debe ser constante (13) (14) (15). De no usarse recipientes en paralelo, el número de peces del grupo de control ha de ser igual al empleado en cada concentración de ensayo.

Si el análisis de la varianza (ANOVA) se realiza en los recipientes y no a nivel individual [lo cual requeriría marcar todos los peces o utilizar las tasas de crecimiento pseudoespecífico (véase el punto 2.1.2)], se necesita una cantidad suficiente de recipientes en paralelo para poder determinar la desviación estándar de los recipientes con la misma concentración, lo cual significa que el error del análisis de la varianza tendrá al menos 5 grados de libertad (11). Si solo se emplean recipientes en paralelo para los controles, se corre el riesgo de que la variabilidad del error esté sesgada, pues podría aumentar con el valor medio de la tasa de crecimiento en cuestión. Dado que es probable que la tasa de crecimiento disminuya cuando aumente la concentración, se tendería a sobrestimar la variabilidad.

1.8. PROCEDIMIENTO

1.8.1. **Selección y pesaje de los peces**

Es importante que el peso de los peces varíe lo menos posible al inicio del ensayo. En el apéndice I figuran las gamas de peso apropiadas en cada una de las especies recomendadas para el ensayo. Conviene que, al principio del ensayo, la gama de pesos de todo el lote de peces utilizados se mantenga en un intervalo de ± 10 % de la media aritmética y, en cualquier caso, no supere el 25 %. Se recomienda pesar una submuestra de peces antes del ensayo para calcular el peso medio.

▼B

No se proporciona alimento alguno a los peces durante las 24 horas anteriores al inicio del ensayo. A continuación, se toman los peces al azar. Se emplea un anestésico general [por ejemplo, una solución acuosa de 100 mg/l de metanosulfonato de tricaína (MS 222) neutralizada mediante adición de dos partes de bicarbonato sódico por parte de MS 222] para pesar cada sujeto en húmedo (secado con material absorbente) con la precisión indicada en el apéndice 1. Se apartan los peces cuyo peso se halla en el intervalo deseado y se reparten al azar entre los recipientes de ensayo. Se registra el peso húmedo total de los peces de cada recipiente. Tanto el uso de anestésico como la manipulación (incluido el secado y pesaje) pueden afectar y herir a los peces juveniles, sobre todo si se trata de especies de pequeño tamaño. Por ello, deben manipularse los animales objeto del ensayo con la mayor precaución para evitar cualquier agresión.

Se vuelven a pesar los peces el 28º día de ensayo (véase el punto 1.8.6). No obstante, si se considera necesario ajustar la ración alimentaria, pueden pesarse los peces el 14º día de ensayo (véase el punto 1.8.2.3). Para valorar las variaciones de tamaño de los peces y, de ahí, ajustar la ración alimentaria, también puede emplearse otro método como el fotográfico.

1.8.2. **Condiciones de exposición**

1.8.2.1. *Duración*

La duración del ensayo es > 28 días.

1.8.2.2. *Tasa de carga y densidad de población*

Es importante que la tasa de carga y la densidad sean apropiadas para la especie de ensayo empleada (véase el apéndice 1). La tensión que genera a los peces una densidad de población demasiado elevada produce una disminución de la tasa de crecimiento y posiblemente la enfermedad. Por el contrario, si la densidad es demasiado baja, puede dar lugar a un comportamiento territorial, lo cual también puede afectar al crecimiento. En cualquier caso, la tasa de carga debe ser suficientemente baja para poder mantener sin aireación una concentración mínima de oxígeno disuelto del 60 % del valor de saturación en el aire. Un ensayo interlaboratorios (3) ha puesto de manifiesto que, en el caso de la trucha arco iris, resulta aceptable una tasa de carga de 16 truchas de 3 a 5 g en un volumen de 40 1. Se recomienda una frecuencia de renovación del agua durante el ensayo de 6 l/g de pez/día.

1.8.2.3. *Alimentación*

Debe proporcionarse a los peces una dieta suficiente y adecuada (apéndice 1) para permitir una tasa de crecimiento aceptable, al tiempo que se evita la proliferación bacteriana y la turbidez del agua. En el caso de la trucha arco iris, esas condiciones deberían conseguirse con una ración diaria del 4 % de su peso corporal (3) (16) (17) (18). La ración diaria puede dividirse en dos partes iguales y administrarse en dos veces, con un mínimo de 5 horas de intervalo. La ración es función del peso inicial total de los peces de cada recipiente de ensayo. Si los peces se pesan otra vez el 14º día de ensayo, se vuelve a calcular la ración. La alimentación debe suprimirse durante las 24 horas anteriores al pesaje.

▼B

Todos los días debe limpiarse cuidadosamente por succión el fondo de los recipientes de ensayo para eliminar los alimentos que no se hayan consumido y la materia fecal.

1.8.2.4. *Iluminación y temperatura*

El fotoperíodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (véase el apéndice 1).

1.8.3. **Concentraciones de ensayo**

Normalmente se necesitan cinco concentraciones de sustancia de ensayo, sea cual sea el diseño del mismo (véase el punto l.7.2). Para seleccionar las concentraciones apropiadas es útil conocer previamente la toxicidad de la sustancia de ensayo (por ejemplo, gracias a un ensayo de toxicidad aguda o un estudio de determinación de gamas). El empleo de menos de cinco concentraciones debe justificarse. Las sustancias no deben someterse a ensayo en concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el agua.

Si se emplea un agente de disolución para facilitar la preparación de la solución madre, su concentración final ha de ser preferiblemente la misma en todos los recipientes de ensayo y no debe superar 0,1 ml/l (véase el punto 1.6.3). No obstante, debe evitarse en la medida de lo posible el empleo de tales agentes.

1.8.4. **Controles**

El número de recipientes de control con agua de dilución dependerá del diseño del ensayo (véanse los puntos 1.7 a 1.7.2). Si se emplea un agente de disolución, se realizará la misma cantidad de controles con agua de dilución que con agente de disolución.

1.8.5. **Frecuencia de los análisis y mediciones**

Las concentraciones de la sustancia de ensayo deben determinarse periódicamente durante el mismo (véase más adelante).

En los ensayos dinámicos, debe comprobarse periódicamente, a ser posible todos los días, los flujos de diluyente y de solución madre de sustancia tóxica. Dichos flujos no deberían variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Cuando la concentración de la sustancia deba permanecer entre el ± 20 % de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80 al 120 %; véanse los puntos 1.6.2 y 1.6.3), se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta al principio del ensayo y, a continuación, una vez por semana. En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal (con arreglo a los datos de estabilidad de la sustancia), es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo, pero según el mismo régimen.

En los ensayos semiestáticos (con renovación) en que la concentración de la sustancia debe permanecer entre el + 20 % de la concentración nominal, se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta en cuanto se preparen y justo antes de renovar el medio al principio del estudio y, a continuación, una vez por semana. En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal, es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo según el mismo régimen que el empleado con las sustancias más estables.

▼B

Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. No obstante, si los datos disponibles muestran que la concentración de la sustancia de ensayo en la solución se ha mantenido debidamente a lo largo de todo el ensayo en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la concentración medida al inicio, los resultados pueden fundarse en las concentraciones nominales o en las medidas.

En algunos casos puede estar indicado filtrar (por ejemplo, con un filtro de poros de 0,45 μm) o centrifugar las muestras. Aunque la centrifugación es el método recomendado, si el medio de ensayo no se absorbe en los filtros, también puede emplearse la filtración.

Durante el ensayo debe medirse en todos los recipientes de ensayo el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura. En los controles y en un uno de los recipientes con la concentración más alta se medirán la dureza total, la alcalinidad y la salinidad, si procede. El oxígeno disuelto y la salinidad, cuando proceda, se medirán como mínimo tres veces: al principio, a la mitad y al final del ensayo. En los ensayos semiestáticos se recomienda medir el oxígeno disuelto más a menudo, preferiblemente antes y después de cada renovación del agua o al menos una vez por semana. El pH ha de medirse al principio y al final de cada período de renovación del agua en los ensayos semiestáticos y al menos una vez por semana en los dinámicos. La dureza y la alcalinidad se medirán una vez en cada ensayo. La temperatura debería someterse a control continuo al menos en un recipiente de ensayo.

1.8.6. **Observaciones**

Peso: al final del ensayo deben pesarse en húmedo (secados con material absorbente) todos los peces vivos, en grupos por recipiente de ensayo o individualmente. Es preferible pesar los animales por recipiente, pues el pesaje individual requiere marcar todos los peces. Si se determina la tasa de crecimiento específico de cada pez (pesaje individual), se optará por una técnica de marcado que no perturbe a los animales (en lugar del criomar-cado puede emplearse, por ejemplo, hilo fino de pescar de colores).

Deben examinarse los peces todos los días durante el ensayo y registrarse toda anomalía externa (hemorragias, despigmentación, etc.) y todo comportamiento anómalo. Se tomará nota de todas las muertes y se retirarán los peces muertos lo antes posible. Estos no se sustituirán, ya que la tasa de carga y la densidad de población son suficientemente elevadas para evitar que la variación del número de peces en un recipiente afecte al crecimiento. Sin embargo, deberá adaptarse la ración alimentaria.

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Es aconsejable que participe un estadístico tanto en el diseño como en el análisis del ensayo, pues el presente método da cabida a variaciones considerables en el procedimiento experimental, por ejemplo, en cuanto al número de recipientes y de concentrationes de ensayo, el número de peces, etc. Debido a las diversas posibilidades en el diseño del ensayo, no se proporcionan aqui directrices concretas sobre los métodos estadísticos.

▼B

No es preciso calcular la tasa de crecimiento en los recipientes de ensayo en los que la mortalidad es superior al 10 %, si bien debe indicarse la tasa de mortalidad a todas las concetraciones de ensayo.

Con independencia del método empleado par analizar los datos, el concepto central es la tasa de crecimiento específico *r* entre el momento $t_1$ y el momento $t_2$, que puedo definirse de varias formas según si los peces se han marcado individualmente o no o si se necessita una media por recipiente.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

donde:

$r_1$ = tasa de crecimiento específico de cada pez,

$r_2$ = tasa de crecimiento específico medio por recipiente,

$r_3$ = tasa de crecimiento pseudoespecífico,

$w_1$, $w_2$ = peso de un pez determinado en los momentos $t_1$ y $t_2$, respectivamente,

$\log_e w_1$ = logaritmo del peso de un pez determinado al inicio del período de estudio,

$\log_e w_2$ = logaritmo del peso de un pez determinado al final del período de estudio,

$\log_e W_1$ = media de los logaritmos de los valores $w_1$ de los peces del recipiente al inicio del período de estudio,

$\log_e W_2$ = media de los logaritmos de los valores $w_2$ de los peces del recipiente al final del período de estudio.

$t_1$, $t_2$ = tiempo (días) inicial y fin del período de estudio

$r_1$, $r_2$, $r_3$ pueden calcularse para el período comprendido entr el día 0 y el día 28 y, si procede (es decir, si se han realizado mediciones el día 14), para los períodos entre los días 0 y 14, y 14 y 28.

2.1.1. **Análisis de los resultados por regresión (modelización concentración-repuesta)**

Este método de análisis establece una relación matemática adecuada entre la tasa de crecimiento específico y la concentración, lo cual permite calcular la «$EC_x$», es decir, todo valor de EC necesario. Con este método no es preciso calcular ($r_2$). Es preferible este ultimo método y, además, resultas más adecuado si se utilizan especies más pequeñas.

Con el fin de estudiar la relación concentratión-respuesta, debe hacerce una representación gráfica de las tasas de crecimiento específico medio por recipiente *($r_2$)* en función de la concentración.

▼B

Para expresar la relación entre $r_2$ y la concentración, debe elegirse un modelo adecuado y justificarse la elección mediante un razonamiento pertinente.

Si el número de peces que sobreviven varía de un recipiente a otro, debe ponderarse el proceso de ajuste del modelo para tener en cuenta el tamaño desigual de los grupos.

El método de ajuste del modelo debe permitir estimar, por ejemplo, la $EC_{20}$ y deducir su dispersión (error típico o intervalo de confianza). El gráfico del modelo ajustado debe figurar junto a los datos para poder valorar la adecuación del ajuste del modelo (9) (19) (20) (21).

2.1.2. **Análisis de los resultados para calcular la LOEC**

Si en el ensayo se han utilizado series en paralelo para todas las concentraciones, la estimación de la LOEC podría basarse en el análisis de la varianza (ANOVA) de la tasa de crecimiento específico medio de cada recipiente (véase el punto 2.1), seguido de un método adecuado [por ejemplo, el de Dunnett o de Williams (13) (14) (15) (22)] para comparar la media r a cada concentración con la media r de los controles con el fin de determinar la concentración mínima a la que dicha diferencia es significativa para p = 0,05. Si las hipótesis necesarias relativas a los métodos paramétricos no se cumplen —distribución no normal (por ejemplo, prueba de Shapiro-Wilk) o varianza heterogénea (prueba de Bartlett)—, deberá estudiarse la posibilidad de transformar los datos para homogeneizar las varianzas antes de efectuar el análisis de la varianza (ANOVA) o el análisis ponderado de la varianza (ANOVA).

Si en el ensayo no se han utilizado series en paralelo para todas las concentraciones, el análisis de la varianza (ANOVA) basado en los recipientes resultará insensible o imposible. En ese caso, puede considerarse aceptable basar el análisis de la varianza (ANOVA) en la tasa de crecimiento pseudoespecífico $r_3$ de cada pez.

A continuación puede compararse la media r, para cada concentración de ensayo con la media $r_3$ de los controles, tras lo cual puede determinarse la LOEC como anteriormente. Debe admitirse que este método no tiene cuenta en absoluto la variabilidad entre recipientes, al margen de la imputable a la variabilidad entre los peces. Sin embargo, la experiencia ha puesto de manifiesto (9) que la variabilidad entre recipientes es muy escasa en relación con la variabilidad dentro de un mismo recipiente (es decir, entre los peces). Si el análisis no incluye los datos relativos a cada pez, deberá indicarse el método de identificación de los valores atípicos y justificarse su utilización.

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben interpretarse con prudencia si las concentraciones medidas de las sustancias tóxicas en las soluciones de ensayo se aproximan a los límites de detección del método de análisis o, en los ensayos semi-estáticos, si la concentración de sustancia de ensayo disminuye entre el momento en que se prepara la solución y el momento previo a la renovación.

2.3. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

▼B

2.3.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes,

— identificación química, incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia de ensayo, si procede.

2.3.2. **Especie sometida a ensayo:**

— denominación científica,

— cepa, tamaño, proveedor, tratamientos previos, etc.

2.3.3. **Condiciones de ensayo:**

— método empleado (por ejemplo, semiestático/renovación o dinámico, carga, densidad de población, etc.),

— diseño del ensayo (por ejemplo, número de recipientes de ensayo, de concentraciones de ensayo y de recipientes en paralelo, número de peces por recipiente),

— método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificarán el agente de disolución empleado y su concentración),

— concentraciones nominales de ensayo, medias de los valores determinados analíticamente en los recipientes de ensayo, desviaciones estándar de estos, método de obtención y datos que muestren que las mediciones se refieren a las concentraciones de la sustancia de ensayo en disolución verdadera,

— características del agua de dilución: pH, dureza, alcalinidad, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada,

— calidad del agua en los recipientes de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto,

— información detallada de la alimentación (por ejemplo, tipo de alimento o alimentos, procedencia, cantidad proporcionada y frecuencia).

2.3.4. **Resultados:**

— datos que demuestren que los controles cumplen los criterios de validez relativos a la supervivencia y datos de la mortalidad observada en todas las concentraciones de ensayo,

— técnicas de análisis estadístico aplicadas, estadísticas basadas en las series en paralelo o en los peces, tratamiento de los datos y justificación de los métodos empleados,

— cuadros que recojan el peso individual y medio de los peces los días 0, 14 (si se han pesado) y 28, valores de las medias por recipiente o tasas de crecimiento pseudoespecífico (si procede) correspondientes a los períodos de 0 a 28 días o, en su caso, de 0 a 14 y de 14 a 28,

— resultados del análisis estadístico [análisis de regresión o análisis de la varianza (ANOVA)], preferiblemente nen forma de cuadro y de gráfico. LOEC ($p = 0,05$) y NOEC o EC con sus errores típicos, si es posible.

▼B

— incidencia de toda reacción anómala de los peces y de todo efecto visible producido por la sustancia de ensayo.

3. REFERENCIAS

(1) Solbe J.F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 93 50 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth rate of Fish. WRc Report No. PRD 1388-M/2.

(2) Meyer, A., Bierman, C.H. y Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish *(Danio reno),* a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method, Proc. R. Soc. Lond. B. 252, 231-236

(3) Ashley S., Mallett M.J. y Grandy N.J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M. Crossland N.O. (1985). A method to evalúate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.

(4) Crossland N.O. (1985). A method to evalúate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, pp 1855-1870.

(5) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P.D., Market M, Munk R., Scholz N. y Hófte B.B. (1991). Effect of 3.4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish *(Brachydanio rerio):* results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety. 21. pp 157-164.

(6) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio. Japón.

(7) Holcombe . G.W.. Benoit D.A., Hammermeister, D.E., Leonard, E.N. y Johnson, R.D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (Oryzias latipes). Arch. Environ. Coma. Toxicol. 28, pp 287-297.

(8) Benoit, D.A., Holcombe, GAV. y Spehar, R.L. (199l). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes).* Ecological Research Series EPA-600:3-91-06 3. U. S. Environmental Protection Agency, Duluth. Minesota.

(9) Stephan CE. y Rogers J.W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R C Bahner y D J Hansen. Eds. American Society for Testing and Materials, Filadelfia, pp 328-338.

(10) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS l/RM/28, 81 p.

(11) Cox D.R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(12) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham. UK, 10-12 diciembre de 1991.

(13) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp 1096-1121.

▼B

(14) Dunnett C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, pp 482-491.

(15) Williams D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, pp 103-117.

(16) Johnston, W.L., Atkinson. J.L., Glanville NT. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss:* effect of feeding level. Aquaculture 120, 123-13 3.

(17) Quinton, J. C. y Blake, R.W. (1990). The effect of feed cycling and radon level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynhus* mykiss. Journal of Fish Biology, 37, 33-41.

(18) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City. Nueva Jersey, E.E.U.U. 288 P.

(19) Bruce, R.D. y Vorsteeg D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data . Environ. Toxicol. Chem. 11, 1485-1494.

(20) DeGraeve, G.M., Cooney, J.M., Pollock, T.L., Reichenbach, J.H., Dean, Marcus, M.D. y Mclntyre, D.O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, n. 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(21) Norbert-King T.J. (1988). An interpolation estímate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 pp.

(22) Williams D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, pp 510-531.

▼B

*Apéndice 1*

**ESPECIES DE PECES RECOMENDADAS Y CONDICIONES ADECUADAS PARA EL ENSAYO**

| Especie | Gama de temperatura recomendada (°C) | Fotoperíodo (horas) | Gama recomendada de peso inicial de los peces (g) | Precisión exigida de la medición | Tasa de carga (g/l) | Densidad de población (por litro) | Alimentación | Duración del ensayo (días) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Especie recomendada:** | | | | | | | | |
| *Oncorhynchus mykiss*<br>Trucha arco iris | 12,5 - 16,0 | 12-16 | 1-5 | 100 mg | 1,2 - 2,0 | 4 | Especialidad alimentaria seca para crías de salmónidos | > 28 |
| **Otras especies bien documentadas:** | | | | | | | | |
| *Danio rerio*<br>Pez cebra | 21-25 | 12-16 | 0,050 - 0,100 | 1 mg | 0,2 - 1,0 | 5-10 | Alimento vivo *(Brachionus artemia)* | > 28 |
| *Oryzias latipes*<br>Medaka | 21-25 | 12-16 | 0,050 - 0,100 | To nearest 1 mg | 0,2 - 1,0 | 5-20 | Alimento vivo *(Brachionus artemia)* | > 28 |

02008R0440 — ES — 16.10.2019 — 008.001 — 1717

▼B

*Apéndice 2*

**ALGUNAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE**

| Sustancia | Concentraciones |
|---|---|
| Materia en suspensión | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoniaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Cloro residual | <10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

▼B

*Apéndice 3*

**Series logarítmicas de concentraciones válidas para un ensayo de toxicidad (10)**

| Columna (Número de concentraciones entre 100 y 10, o entre 10 y 1) (*) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 46 | 56 | 63 | 68 | 72 | 75 |
| 10 | 22 | 32 | 40 | 46 | 52 | 56 |
| 3,2 | 10 | 18 | 25 | 32 | 37 | 42 |
| 1,0 | 4,6 | 10 | 16 | 22 | 27 | 32 |
| | 2,2 | 5,6 | 10 | 15 | 19 | 24 |
| | 1,0 | 3,2 | 6,3 | 10 | 14 | 18 |
| | | 1,8 | 4,0 | 6,8 | 10 | 13 |
| | | 1,0 | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10 |
| | | | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
| | | | 1,0 | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
| | | | | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
| | | | | 1,0 | 1,9 | 3,2 |
| | | | | | 1,4 | 2,4 |
| | | | | | 1,0 | 1,8 |
| | | | | | | 1,3 |
| | | | | | | 1,0 |

(*) Puede seleccionarse una serie de 5 (o más) concentraciones sucesivas en una columna. Los puntos medios entre las concentraciones de la columna (x) se encuentran en la columna (2x + 1)l Los valores recogidos pueden representar concentraciones expresadas como porcentaje en volumen o en peso (mg/l o µg/l). Los valores pueden multiplicarse o dividirse por la potencia de 10 adecuada. Puede emplearse la primera columna si el grado de toxicidad es muy incierto.

▼B

## C.15. ENSAYO DE TOXICIDAD A CORTO PLAZO EN *EMBRIONES* DE PEZ Y ALEVINES

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo de toxicidad a corto plazo reproduce las directrices del documento OCDE TG 212 (1998).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines abarca la exposición del animal desde la fase de huevo recién fecundado hasta el final de la fase de alevín. No se proporciona alimento alguno a embriones y alevines durante el ensayo, que debe, por tanto, concluir cuando los alevines sigan nutriéndose de la vesícula vitelina.

El presente ensayo tiene por objeto determinar los efectos letales y, en menor medida, subletales de sustancias químicas en fases concretas de la vida de las especies sometidas al mismo. Proporciona información útil, pues puede: a) constituir un nexo entre los ensayos letales y subletales; b) servir de ensayo de detección de cara a un ensayo completo en las primeras fases de la vida o a los ensayos de toxicidad crónica, y c) emplearse para estudiar especies en relación con las cuales las técnicas de cría no estén suficientemente avanzadas para abarcar el período de transición de la alimentación endógena a la exógena.

Cabe señalar que los ensayos que abarcan todas las fases de la vida de los peces son los únicos que suelen permitir una estimación precisa de la toxicidad crónica de las sustancias químicas en estos animales y que, si se limita la exposición de manera que no cubra una u otra fase de la vida, puede perderse sensibilidad y, por tanto, subestimarse la toxicidad crónica. Por consiguiente, el ensayo en embriones y alevines resultará menos sensible que un ensayo completo en las primeras fases de la vida, sobre todo si se trata de sustancias muy lipó-filas (log $P_{ow}$ > 4) o sustancias que posean una forma de actuación tóxica particular. Cabe esperar, no obstante, que la diferencia de sensibilidad entre los dos ensayos sea menor con las sustancias de acción narcótica no específica (1).

Hasta la publicación del presente ensayo, el ensayo con embriones y alevines se ha llevado a cabo principalmente con el pez de agua dulce *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (teleósteos, ciprínidos, nombre común: pez cebra); de ahí que en el apéndice 1 figuren indicaciones detalladas para la realización del mismo con esa especie, si bien pueden emplearse otras con las que se disponga de experiencia (cuadros 1A y 1B).

### 1.2. DEFINICIONES

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC):** concentración más baja de sustancia de ensayo con la que se observa un efecto significativo (para $p < 0,05$) en comparación con el control. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC han de provocar un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración.

**Concentración (máxima) sin efecto observado (NOEC):** concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC.

▼B

1.3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

Se exponen los embriones de pez y los alevines a una gama de concentraciones de la sustancia de ensayo disuelta en agua. El protocolo permite elegir entre un procedimiento semiestático o dinámico, según la naturaleza de la sustancia de ensayo. El ensayo comienza cuando se colocan los huevos fecundados en los recipientes de ensayo y finaliza justo antes de que la vesícula vitelina de cualquiera de las larvas de cualquiera de los recipientes sea reabsorbida por completo o antes de que los animales del lote de control empiecen a morir de inanición. Los efectos letales y subletales se evalúan y comparan con los valores del control con el fin de determinar la concentración mínima con efecto observado y, de ahí, la concentración máxima sin efecto observado. Los efectos también pueden analizarse mediante un modelo de regresión a fin de calcular la concentración que provocaría un porcentaje de efecto determinado (CL/$EC_X$, donde x es un porcentaje de efecto definido).

1.4. INFORMACIÓN RELATIVA A LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Debe disponerse de los resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase el método C.1) efectuado preferiblemente con la especie objeto del presente ensayo, ya que pueden resultar útiles para seleccionar una gama apropiada de concentraciones para el ensayo en las primeras fases de la vida. Debe conocerse la solubilidad en el agua (incluida la solubilidad en el agua del ensayo) y la presión de vapor de la sustancia de ensayo. Para calcular la cantidad de sustancia en las soluciones de ensayo debe aplicarse un método analítico fiable, cuyo límite de detección y precisión sean conocidos y figuren en el informe.

La información útil para establecer las condiciones de ensayo incluye la fórmula estructural de la sustancia de ensayo, su pureza, estabilidad a la luz, estabilidad en las condiciones de ensayo, pKa, $P_{ow}$ y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (véase el método C.4).

1.5. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la tasa global de supervivencia de los huevos fecundados en los lotes de control y, en su caso, en los recipientes que solo contengan disolvente ha de ser superior o igual a los límites establecidos en los apéndices 2 y 3,

— la concentración de oxígeno disuelto ha de situarse entre el 60 y el 100 % del valor de saturación en el aire a lo largo del ensayo,

— en ningún momento del ensayo la temperatura del agua debe variar en más de ± 1,5 °C entre los recipientes de ensayo ni entre dos días sucesivos y debe mantenerse en las gamas establecidas para la especie sometida a ensayo (apéndices 2 y 3).

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.6.1. **Recipientes de ensayo**

Puede emplearse cualquier recipiente de cristal u otro material inerte químicamente, de dimensiones suficientes para que se cumplan los criterios de carga (véase el punto 1.7.1.2). Se recomienda colocar los recipientes al azar en la zona donde se lleve a cabo el ensayo. Si en el laboratorio hay efectos sistemáticos que pueden paliarse mediante el agrupamiento, es preferible colocar los recipientes según un esquema de agrupamiento aleatorizado (velando por que todos los tratamientos se apliquen en todos los grupos) que según un esquema completamente aleatorizado. En caso de que se agrupen los recipientes, debe tenerse presente en el análisis posterior de los datos. Los recipientes de ensayo han de protegerse de toda perturbación indeseada.

1.6.2. **Selección de la especie de peces**

Las especies de peces recomendadas figuran en el cuadro 1A, aunque es posible emplear otras (cuadro 1B), si bien entonces puede ser necesario adaptar el procedimiento para que las condiciones de ensayo sean adecuadas. En tal caso, deben justificarse la elección de la especie y el método experimental.

1.6.3. **Manipulación de los peces reproductores**

Las directrices de ensayo 210 de la OCDE ([1]) y las referencias (2) (3) (4) (5) (6) de la bibliografía recogen indicaciones detalladas sobre la manipulación de peces reproductores en condiciones satisfactorias.

1.6.4. **Manipulación de los embriones y las larvas**

Los embriones y las larvas pueden colocarse en receptáculos provistos de paredes o extremos de malla dentro del recipiente principal para permitir el flujo de la solución de ensayo. Puede provocarse un flujo no turbulento a través de los pequeños receptáculos suspendiéndolos de un brazo que los desplace en sentido vertical, pero de manera que los organismos permanezcan siempre sumergidos. Puede emplearse, asimismo, un sistema de sifón. Los huevos fecundados de salmónidos pueden depositarse en rejillas o mallas con aperturas de dimensiones suficientes para que las larvas pasen a través después de la eclosión. En los ensayos semiestáticos con renovación diaria y completa del medio, conviene utilizar pipetas Pasteur para la toma de embriones y larvas (véase el punto 1.6.6).

Si se utilizan cubetas, rejillas o mallas para mantener los huevos en el recipiente principal de ensayo, deben retirarse después de la eclosión de las larvas ([1]), pero deben conservarse las mallas que impidan que los peces se escapen. Si es necesario trasladar las larvas, no deben exponerse al aire ni emplearse redes para sacar a los peces de los recipientes que contengan los huevos (con algunas especies menos frágiles, como la carpa, estas precauciones pueden resultar superfluas). El momento de dicho traslado varía según la especie y no siempre es necesario. En los ensayos semiestáticos, pueden emplearse vasos de laboratorio o recipientes poco profundos y provistos, en su caso, de una rejilla a escasa distancia del fondo. Si el volumen de esos recipientes es suficiente para que se cumplan los requisitos de carga (véase el punto 1.7.1.2), no es preciso trasladar los embriones o larvas.

([1]) OECD, París. 1992. Directrices de ensayo 210. «Ensayo de toxicidad en las primeras fases de la vida en peces».

▼B

1.6.5. **Agua**

Puede utilizarse para el ensayo toda agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable enumeradas en el apéndice 4 y en la que la especie sometida a ensayo muestre una tasa de supervivencia en el lote de control al menos igual que la recogida en los apéndices 2 y 3. Su calidad ha de ser constante a todo lo largo del ensayo. La variación del pH debe permanecer en un intervalo de ± 0,5 unidades. Deben tomarse muestras periódicamente para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación de la sustancia de ensayo) ni altera el comportamiento de los peces reproductores. Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, conviene proceder, por ejemplo, cada 3 meses, a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd y Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, Ca, Mg, Na, K, Cl y $SO_4$), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, los análisis pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada 6 meses).

1.6.6. **Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de la solución madre.

La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación mecánica de la sustancia de ensayo en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad) para lograr la concentración adecuada de solución madre. Debe evitarse, en la medida de lo posible, el uso de disolventes o dispersantes (agentes de disolución); sin embargo, en algunos casos pueden ser necesarios para obtener una solución madre a la concentración deseada. Puede entonces utilizarse como disolvente acetona, etanol, metanol, dimetilformamida o trietilenglicol, y como dispersante Cremophor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % o HCO-40. Deben tomarse precauciones si se emplean agentes fácilmente biodegradables (como la acetona) y/o muy volátiles, pues estos pueden dar lugar a una proliferación bacteriana en los ensayos dinámicos. Si se emplea un agente de disolución, no debe actuar de forma significativa sobre la supervivencia ni producir efectos nocivos visibles en las primeras fases de la vida, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo contenga disolvente. No obstante, debe hacerse todo lo posible por evitar el uso de dichas sustancias.

En el caso de los ensayos semiestáticos, pueden aplicarse dos métodos distintos de renovación: o bien se preparan sustancias de ensayo nuevas en recipientes limpios y se transfieren cuidadosamente los huevos y larvas supervivientes en un pequeño volumen de la solución antigua, evitando exponerlos al aire, o bien se dejan los organismos sometidos a ensayo en su recipiente y se cambian al menos las tres cuartas partes del agua de ensayo. La frecuencia de renovación del medio dependerá de la estabilidad de la sustancia de ensayo, si bien se recomienda renovarlo todos los días. Si los ensayos preliminares de estabilidad (véase el punto 1.4) ponen de manifiesto que la concentración de la sustancia de ensayo no es estable (es decir, queda fuera del intervalo del 80 al 120 % de la concentración nominal o cae por debajo del 80 % de la concentración medida al inicio) entre dos renovaciones, debe plantearse la realización de un ensayo dinámico. En cualquier caso, debe velarse por evitar toda agresión a las larvas durante la renovación del agua.

▼B

Para los ensayos dinámicos se requiere un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre de la sustancia de ensayo (por ejemplo, bomba dosificadora, diluyente proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los regímenes de flujo de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad, preferiblemente todos los días, y no debería variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Se considera adecuado un régimen de flujo equivalente al menos a 5 veces el volumen del recipiente de ensayo cada 24 horas (2).

1.7. PROCEDIMIENTO

Se ha publicado información útil sobre la realización de los ensayos de toxicidad en embriones de pez y alevines. La bibliografía del presente texto recoge algunos ejemplos (7) (8) (9) de tales publicaciones.

1.7.1. **Condiciones de exposición**

1.7.1.1. *Duración*

Conviene iniciar el ensayo en los 30 minutos siguientes a la fecundación de los huevos. Los embriones se sumergen en la solución de ensayo antes o después (pero lo antes posible) de que comience la fase de división del blastodisco y, en cualquier caso, antes de que empiece la fase de gástrula. Si los huevos proceden de un proveedor comercial, puede resultar imposible iniciar el ensayo inmediatamente después de la fecundación. Dado que un retraso en el inicio del ensayo puede afectar seriamente a la sensibilidad del mismo, debería iniciarse en las 8 horas siguientes a la fecundación. Puesto que no se proporciona alimento a las larvas durante el período de exposición, el ensayo debe finalizar justo antes de que se haya reabsorbido por completo la vesícula vitelina de una cualquiera de las larvas de cualquiera de los recipientes de ensayo o antes de que haya muertes por inanición en los lotes de control. La duración del ensayo dependerá de la especie utilizada. Los apéndices 2 y 3 recogen recomendaciones al respecto.

1.7.1.2. *Carga*

El número de huevos fecundados al principio del ensayo ha de ser suficiente para responder a las necesidades estadísticas. Se reparten al azar entre los distintos tratamientos y se coloca un mínimo de 30 huevos fecundados, repartidos equitativamente (o lo más equitativamente posible, ya que con algunas especies es difícil obtener lotes iguales) entre, al menos, tres recipientes de ensayo en paralelo por cada concentración. La tasa de carga (biomasa por volumen de ensayo de solución) debe ser suficientemente baja para poder mantener sin aireación una concentración mínima de oxígeno disuelto del 60 % del valor de saturación en el aire. En los ensayos dinámicos, se recomienda una tasa de carga que no supere 0,5 g/l en 24 horas ni 5 g/l de solución en cualquier momento (2).

1.7.1.3. *Iluminación y temperatura*

El fotoperíodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (apéndices 2 y 3). Para vigilar la temperatura puede ser conveniente emplear un recipiente de ensayo adicional.

▼B

1.7.2. **Concentraciones de ensayo**

Normalmente se necesitan 5 concentraciones de sustancia de ensayo espaciadas por un factor constante que no supere 3.2. Para seleccionar la gama de concentraciones de ensayo debe tenerse presente la curva $CL_{50}$/período de exposición del estudio de toxicidad aguda. En algunos casos puede estar indicado utilizar menos de 5 concentraciones, por ejemplo, en los ensayos límite, y un intervalo más pequeño entre concentraciones. El empleo de menos de 5 concentraciones debe justificarse. No es preciso someter a ensayo concentraciones superiores a la $CL_{50}$ tras 96 horas, o a 100 mg/l, si esta concentración es inferior a dicha $CL_{50}$. Las sustancias no deben someterse a ensayo en concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el agua de ensayo.

Si se emplea un agente de disolución para facilitar la preparación de las soluciones de ensayo (véase el punto 1.6.6), su concentración final ha de ser la misma en todos los recipientes de ensayo y no debe superar 0,1 ml/l.

1.7.3. **Controles**

Paralelamente a las series tratadas con la sustancia de ensayo, debe hacerse un lote de control con agua de dilución (en tantos ejemplares como sea necesario) y, si procede, otro control con agente de disolución (en tantos ejemplares como sea necesario).

1.7.4. **Frecuencia de los análisis y medidas**

Las concentraciones de la sustancia de ensayo deben determinarse periódicamente durante el mismo.

En los ensayos semiestáticos en que la concentración de la sustancia debe permanecer entre el ± 20 % de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80 al 120 %; véanse los puntos 1.4 y 1.6.6), se recomienda analizar, como mínimo, la concentración de ensayo más baja y la más alta en cuanto se preparen y justo antes de renovar el medio, al menos en tres ocasiones regularmente espaciadas a lo largo del ensayo (los análisis deben practicarse en muestras de la misma solución, tomadas justo después de su preparación y en el momento de la renovación).

En los ensayos en que no quepa esperar que la concentración de sustancia de ensayo permanezca en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal (con arreglo a los datos de estabilidad de la sustancia), es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo cuando se acaben de preparar y en el momento de la renovación, pero según el mismo régimen, es decir, al menos tres veces regularmente espaciadas a lo largo del ensayo. Es suficiente con determinar las concentraciones de la sustancia de ensayo antes de la renovación del medio en un solo recipiente por concentración. Las determinaciones no han de espaciarse más de 7 días. Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. No obstante, si los datos disponibles muestran que la concentración de la sustancia de ensayo en la solución se ha mantenido debidamente a lo largo de todo el ensayo en un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la concentración medida al inicio, los resultados pueden fundarse en estas.

En los ensayos dinámicos, conviene aplicar un régimen de muestreo similar al descrito para los ensayos semiestáticos (si bien en este caso no cabe hacer determinaciones antes de renovar las soluciones). No obstante, si el ensayo dura más de 7 días, puede ser oportuno incrementar el número de tomas de muestras durante la primera semana (por ejemplo, tres series de medidas) para cerciorarse de que las concentraciones de ensayo permanecen estables.

▼B

En algunos casos puede estar indicado filtrar (por ejemplo, con un filtro de poros de 0,45 μm) o centrifugar las muestras, pero, como ni la filtración ni la centrifugación permiten siempre separar la fracción no biodispo-nible de la sustancia de ensayo de su fracción biodisponible, no es indispensable efectuarlas.

Durante el ensayo debe medirse en todos los recipientes de ensayo el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura. En los controles y en un uno de los recipientes con la concentración más alta se medirá la dureza total y la salinidad, si procede. El oxígeno disuelto y la salinidad, cuando proceda, se medirán como mínimo tres veces: al principio, a la mitad y al final del ensayo. En los ensayos semiestáticos se recomienda medir el oxígeno disuelto más a menudo, preferiblemente antes y después de cada renovación del agua o al menos una vez por semana. El pH ha de medirse al principio y al final de cada período de renovación del agua en los ensayos semiestáticos y al menos una vez por semana en los dinámicos. La dureza se medirá una vez en cada ensayo. La temperatura debería medirse todos los días y lo ideal sería un control continuo al menos en un recipiente de ensayo.

1.7.5. **Observaciones**

1.7.5.1. *Fase de desarrollo embrionario*

Al principio de la exposición a la sustancia de ensayo debe comprobarse con tanta precisión como sea posible la fase embrionaria (gástrula) en una muestra representativa de huevos debidamente conservados y limpiados. Puede asimismo consultarse la bibliografía, que recoge descripciones e ilustraciones de las fases embrionarias (2) (5) (10) (11).

1.7.5.2. *Eclosión y supervivencia*

Al menos una vez al día deben observarse y contarse las eclosiones y los supervivientes. Puede ser conveniente efectuar observaciones más frecuentes al principio del ensayo (por ejemplo, cada 30 minutos durante las tres primeras horas), pues en algunos casos el tiempo de supervivencia puede ser más significativo que solo el número de muertes (por ejemplo, si se producen efectos tóxicos agudos). Las larvas y embriones muertos deben retirarse en cuanto se localicen, ya que pueden descomponerse rápidamente. Dicha retirada ha de hacerse con sumo cuidado para no tocar ni dañar físicamente los huevos y larvas adyacentes, pues son extremadamente delicados y sensibles. Los criterios para considerar que un organismo está muerto varían según la fase del desarrollo:

— **huevos:** sobre todo en la fase más temprana, disminución acusada de translucidez y cambio de la coloración debido a la coagulación y/o precipitación de proteínas, que les dan un aspecto blanco opaco,

— **embriones:** ausencia de movimientos corporales y/o ausencia de latido cardíaco y/o decoloración opaca en las especies cuyos embriones son translúcidos normalmente,

— **larvas:** inmovilidad y/o ausencia de movimiento respiratorio y/o ausencia de latido cardíaco y/o coloración blanca opaca del sistema nervioso central y/o ausencia de reacción a los estímulos mecánicos.

▼B

1.7.5.3. *Aspecto anómalo*

El número de larvas que presenten anomalías corporales y/o pigmentarias, así como la fase de reabsorción de la vesícula vitelina deben registrarse a intervalos adecuados con arreglo a la duración del ensayo y la naturaleza de la anomalía observada. Cabe señalar que la aparición de larvas y embriones anómalos ocurre en condiciones normales y que su proporción puede alcanzar varias unidades por cada 100 en los controles de algunas especies. Los animales que presenten anomalías solo deben retirarse de los recipientes de ensayo cuando estén muertos.

1.7.5.4. *Comportamiento anómalo*

Las anomalías como la hiperventilación, natación descoordinada o inactividad atípica deben registrarse a intervalos adecuados según la duración del ensayo. Pese a ser difíciles de cuantificar, estos efectos pueden contribuir a interpretar los datos de mortalidad proporcionando información sobre el modo de actuación tóxica de la sustancia.

1.7.5.5. *Longitud*

Se recomienda medir la longitud de cada sujeto al final del ensayo utilizando la longitud estándar, la longitud a la horquilla o la longitud total. Si se observa una descomposición de la aleta caudal o un desgaste de las aletas, debe emplearse la longitud estándar. Por lo general, en un ensayo realizado correctamente, el coeficiente de variación de la longitud entre los distintos recipientes de los controles ha de ser 20 %.

1.7.5.6. *Peso*

Puede pesarse cada sujeto al final del ensayo; el peso seco (24 horas a 60 $^{o}$C) es preferible al peso húmedo (secados con material absorbente). Por lo general, en un ensayo realizado correctamente, el coeficiente de variación del peso entre los distintos recipientes de los controles ha de ser $\leq$ 20 %.

Gracias a las observaciones anteriores, se obtienen algunos o todos los datos siguientes para el análisis estadístico:

— mortalidad acumulativa,

— número de larvas sanas al final del ensayo,

— momento en que empieza y acaba la eclosión (90 % de eclosiones en cada recipiente en paralelo),

— número de larvas que eclosionan cada día,

— longitud (y peso) de los animales supervivientes al final del ensayo,

— número de larvas con deformidades o aspecto anómalo,

— número de larvas que presenten un comportamiento anómalo.

▼B

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Es aconsejable que participe un estadístico tanto en el diseño como en el análisis del ensayo, pues el presente método da cabida a variaciones considerables en el procedimiento experimental, por ejemplo, en cuanto al número de recipientes y de concentraciones de ensayo, al número inicial de huevos fecundados y a los parámetros medidos. Debido a las diversas posibilidades en el diseño del ensayo, no se proporcionan aquí directrices concretas sobre los métodos estadísticos.

Si tienen que calcularse la LOEC y la NOEC, será preciso analizar las variaciones en cada serie en paralelo mediante el análisis de la varianza (ANOVA) o las tablas de contingencia. El método de Dunnett puede resultar útil para realizar comparaciones múltiples entre los resultados obtenidos con cada concentración y los de los controles (12) (13). Las referencias (14) y (15) de la bibliografía recogen otros ejemplos útiles. Debe calcularse y registrarse la magnitud del efecto detectable mediante el análisis de la varianza (ANOVA) u otros métodos (es decir, la potencia del ensayo). Cabe señalar que no todas las observaciones relacionadas en el punto 1.7.5.6 se prestan al tratamiento estadístico por análisis de la varianza (ANOVA). Así, por ejemplo, la mortalidad acumulativa y el número de larvas sanas al final del ensayo pueden analizarse por métodos de probita.

Si procede calcular la CL y la $EC_X$, una o varias curvas adecuadas, como puede ser la curva logística, deben ajustarse a los resultados pertinentes mediante un método estadístico como el de los mínimos cuadrados o los mínimos cuadrados no lineales. Las curvas deben parametrarse de manera que puedan estimarse directamente la CL y la $EC_X$ que interese y su error estándar. Así se facilitará en gran medida el cálculo de los límites de confianza en torno a la CL y la $EC_X$. Salvo que haya razones de peso para preferir otros niveles de confianza, se seleccionarán límites del 95 % en ambas direcciones. Es preferible que el método de ajuste permita evaluar la significación de la falta de ajuste. Pueden emplearse métodos gráficos para ajustar las curvas. Todas las observaciones enumeradas en el punto 1.7.5.6 se prestan al análisis de regresión.

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben interpretarse con prudencia cuando las concentraciones medidas de las sustancias tóxicas en las soluciones de ensayo se aproximen a los límites de detección del método de análisis. Asimismo, los resultados relativos a concentraciones superiores a la solubilidad de la sustancia en el agua han de interpretarse con precaución.

2.3. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.3.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes,

— identificación química, incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia de ensayo, si procede.

▼B

2.3.2. **Especie sometida a ensayo:**

— denominación científica, variedad, número de peces parentales (es decir, número de hembras empleadas para obtener la cantidad de huevos necesarios para el ensayo), fuente y método de recogida de los huevos fecundados y manipulaciones posteriores.

2.3.3. **Condiciones de ensayo:**

— método empleado (por ejemplo, semiestático o dinámico, tiempo transcurrido entre la fecundación y el inicio del ensayo, carga, etc.),

— fotoperíodo(s),

— diseño del ensayo (por ejemplo, número de recipientes de ensayo y número de recipientes en paralelo, número de embriones por recipiente en paralelo),

— método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificarán el agente de disolución empleado y su concentración),

— concentraciones nominales de ensayo, valores medidos en los recipientes de ensayo, medias y desviaciones estándar de estos y método de obtención; si la sustancia de ensayo es soluble en el agua a concentraciones inferiores a las de ensayo, debe demostrarse que las mediciones se refieren a las concentraciones de la sustancia de ensayo en disolución,

— características del agua de dilución: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión, salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada,

— calidad del agua en los recipientes de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto.

2.3.4. **Resultados:**

— resultados de los posibles estudios preliminares relativos a la estabilidad de la sustancia de ensayo,

— datos que demuestren que los controles cumplen la norma general de aceptabilidad en materia de supervivencia de la especie sometida a ensayo (apéndices 2 y 3),

— datos de la mortalidad y la supervivencia en las fases de embrión y de larva y tasas globales de mortalidad y supervivencia,

— días transcurridos hasta la eclosión y número de eclosiones,

— longitud (y peso),

— incidencia y descripción de las anomalías morfológicas, en su caso,

— incidencia y descripción de los efectos sobre el comportamiento, en su caso,

— análisis estadístico y tratamiento de los datos,

— en el caso de los ensayos sometidos al análisis de la varianza, la concentración mínima con efecto observado (LOEC) para $p = 0,05$ y la concentración máxima sin efecto observado (NOEC) para cada respuesta evaluada, así como una descripción de los métodos estadísticos empleados y una indicación de la magnitud del efecto que puede detectarse,

▼B

— en el caso de los ensayos analizados mediante técnicas de regresión, la $CL/EC_x$, e intervalos de confianza, y un gráfico del modelo ajustado que se haya utilizado para su cálculo,

— justificación de toda desviación respecto al presente método de ensayo.

3. **REFERENCIAS**

(1) Kristensen P. (1990) Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, pp. 60. Junio de 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.

(3) Brauhn J.L. y Schoettger R.A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W.A. y Jones B.R. (1977) Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061. Duluth, Minnesota.

(5) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachydanio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, 121-173.

(6) Legault R. (1958) A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328-330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J.E., Rosander B. *y* Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish *(Brachydanio rerio)* Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61-71.

(8) Birge J.W., Black J.A. y Westerman A.G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determinmg the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807-821.

(9) Van Leeuwen C.J., Espeldoorn A. y Mol F. (1986) Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (Salmo gairdneri). J. Aquatic Toxicology, 9, 129-145.

(10) Kirchen R.V. y W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R.V. y W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, Carolina del Norte. 36 pp.

(12) Dunnett C.W. (1955) A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp 1096-1121.

(13) Dunnett C.W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, 482-491.

(14) Mc Clave J.T., Sullivan J.H. y Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Filadelfia.

▼B

(15) Van Leeuwen C.J., Adema D.M.M. y Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321-334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS l/RM/28, Diciembre de 1992, pp. 81.

(17) Dave G. y Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury. Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. of Environmental Contamination and Toxicology, 21, 126-134.

(18) Meyer A., Bierman C.H. y Orti G. (199 3). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*). A model system in developmental biology — an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: 231-236.

(19) Ghillebaert F. Chaillou C, Deschamps F. y Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, 19-28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA repon EPA/600/3-91/064, Dic. 1991. EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dic. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G.M., Cooney J.D., McIntyre D.O., Poccocic T.L., Reichenbach N.G. Dean J.H. y Marcus M.D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (Pimephales promelas) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, 1189-1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells. Oxford. Vol. 1, capítulo 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E.K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.

(25) Blaxter J.H.S. (1988). Pattern and variety in development, In: W.S. Hoar y D.J. Randall Eds., Fish Physiology, vol. XIA, Academic press, pp. 1-58.

*Cuadro 1A*

**Especies de peces recomendadas para el ensayo**

| Agua dulce |
|---|
| *Oncorhynchus mykiss* |
| Trucha arco iris (9) (16) |
| *Danio rerio* |
| Pez cebra (7) (17) (18) |
| *Cyprinus caprio* |
| Carpa común (8) (19) |
| *Oryzias latipes* |
| Medaka (20) (21) |
| *Pimephales promelas* |
| Piscardo (8) (22) |

▼B

*Cuadro 1B*

**Ejemplos de otras especies bien documentada que también han sido utilizadas**

| Agua dulce | Agua salada |
|---|---|
| *Carassius auratus*<br>Carpa dorada (8) | *Menidia peninsulae*<br>Pejerrey del Atlántico Occidental (23) (24) (25) |
| *Lepomis macrochirus*<br>Pez sol de agallas azules (8) | *Clupea harengus*<br>Arenque (24) (25) |
| | *Gadus morhua*<br>Bacalao (24) (25) |
| | *Cyprinodon variegatus*<br>Pelota (23) (24) (25) |

▼B

*Apéndice 1*

**DIRECTRICES SOBRE LA REALIZACIÓN DE UN ENSAYO DE TOXICIDAD EN EMBRIONES Y ALEVINES DE PEZ CEBRA *(BRACHYIANIO RERIO)***

INTRODUCCIÓN

El pez cebra es originario de la costa de Coromandel en la India, donde vive en ríos de corriente rápida. Es una especie común de acuario, que pertenece a la familia de las carpas. La información relativa a los métodos de cría y los cuidados que requieren figuran en los manuales de referencia sobre peces tropicales. Laale ha estudiado su biología y su empleo en la investigación relacionada con la pesca (1).

Este pez rara vez supera los 45 mm de longitud. Su cuerpo cilíndrico posee entre 7 y 9 rayas horizontales de color azul oscuro y plateado, que se prolongan hasta las aletas caudal y anal. El dorso es verde aceituna. Los machos son más estrechos que las hembras, y estas son más plateadas y presentan un abdomen más distendido, en particular antes del desove.

Los peces adultos soportan grandes variaciones de temperatura, pH y dureza. Sin embargo, para obtener peces sanos que produzcan huevos de buena calidad debe mantenérselos en condiciones óptimas.

Durante el desove, el macho persigue a la hembra y le da golpes con la cabeza. Los huevos son fecundados apenas expulsados. Los huevos, que son transparentes y no adherentes, caen al fondo, donde pueden ser ingeridos por los padres. La luz influye en el desove. Si la luz de la mañana es suficiente, los peces suelen desovar en las horas siguientes al amanecer.

Una hembra puede realizar desoves de varios centenares de huevos a intervalos de una semana.

ESTADO DE LOS PECES PARENTALES, REPRODUCCIÓN Y PRIMERAS FASES DE LA VIDA

Se selecciona un número adecuado de peces sanos y se mantienen en un agua apropiada (véase el apéndice 4, por ejemplo) al menos durante dos semanas antes de la fecha prevista para el desove. Los peces han de reproducirse al menos una vez antes de producir los huevos que vayan a emplearse en el ensayo. La densidad en este período no debe superar 1 gramo de peces por litro. La renovación regular del agua y la utilización de sistemas de purificación pueden dar lugar a densidades mayores. La temperatura en los acuarios debe mantenerse a 25 ± 2 °C y debe proporcionarse a los peces un régimen alimentario variado, que puede consistir, por ejemplo, en alimentos deshidratados adecuados que se encuentran en el comercio, Artemia vivos recién eclosionados, quironómidos, Dafnia o gusanos blancos (Enquitreidos).

A continuación se recogen dos métodos con los que se han obtenido en la práctica camadas suficientes de huevos fecundados sanos de cara a la realización de un ensayo:

i) se colocan 8 hembras y 16 machos en un acuario con 50 litros de agua de dilución y protegido de la luz directa. Debe evitarse en la mayor medida posible perturbarlos al menos durante 48 horas. En la tarde del día anterior al inicio del ensayo se coloca en el fondo del acuario un soporte para el desove, formado por un bastidor (de plexiglás u otro material adecuado) de 5 a 7 cm de alto, con una red de malla gruesa (2-5 mm) en la parte superior y una red de malla fina (10-30 μm) en la parte inferior. Se atan a la malla gruesa del soporte varios «árboles de desove», consistentes en una cuerda de nailon sin retorcer. Se deja a los peces 12 horas en la oscuridad y, a continuación, se enciende una luz tenue para que empiece el desove. Entre 2 y 4 horas después de este, se retira el soporte y se recogen los huevos. El soporte impide que los peces ingieran los huevos, al tiempo que facilita la recogida de estos. Los peces deben haber desovado al menos una vez antes de recoger los huevos que vayan a emplearse en el ensayo;

▼B

ii) se mantienen de 5 a 10 peces machos y hembras en acuarios individuales durante un mínimo de 2 semanas antes de la fecha prevista para el desove. Entre 5 y 10 días después, el abdomen de las hembras se distiende y sus papilas genitales se hacen visibles. Los machos no tienen papilas. El desove se lleva a cabo en recipientes provistos de un falso fondo de malla (véase más arriba). El recipiente se llena con agua de dilución hasta una altura de 5 a 10 cm por encima de la malla. Se colocan una hembra y dos machos en el recipiente la víspera de la fecha prevista para el desove. Se aumenta progresivamente la temperatura del agua hasta un grado por encima de la temperatura de aclimatación. Se apaga la luz y se evita en la mayor medida posible toda perturbación de los peces. Por la mañana, se enciende una luz tenue para que empiece el desove. Entre 2 y 4 horas más tarde, se retiran los peces y se recogen los huevos. Si se necesitan más huevos de los que puede poner una hembra, pueden disponerse en paralelo los acuarios que sean necesarios. Si se registra la capacidad de reproducción de cada hembra antes del ensayo (volumen de la camada y calidad de los huevos), podrán seleccionarse para este las que tengan mayor capacidad reproductora.

Los huevos se trasladan a los recipientes de ensayo en tubos de vidrio, de diámetro interno superior o igual a 4 mm y provistos de una pera de succión. El trasvase de huevos debe realizarse con la menor cantidad de agua posible. Los huevos pesan más que el agua y caen fuera del tubo. Debe evitarse que los huevos (y las larvas) estén en contacto con el aire. Se practica un examen microscópico de una o varias muestras del lote o lotes para cerciorarse de que no hay anomalías en las primeras fases del desarrollo. No está permitido desinfectar los huevos.

La tasa de mortalidad de los huevos más elevada se da durante las 24 horas siguientes a la fecundación. A menudo se observa durante ese período una tasa de mortalidad del 5 al 40 %. La degeneración de los huevos se debe a una fertilización fallida o a problemas en el desarrollo. Al parecer, la calidad de los huevos depende de la hembra, ya que algunas producen siempre huevos de buena calidad, mientras que otras no lo consiguen nunca. Además, el ritmo de desarrollo y de eclosión varía de una camada a otra. La tasa de supervivencia de los huevos correctamente fecundados y de las larvas suele ser elevada, por lo general superior al 90 %. A 25 $^{o}$C, los huevos eclosionan entre 3 y 5 días después de la fecundación y la vesícula vitelina se reabsorbe unos 13 días después de esta.

Hisaoka y Battle han estudiado a fondo el desarrollo embrionario (2). La transparencia de los huevos y de las larvas eclosionadas permite seguir el desarrollo de los peces y detectar la presencia de malformaciones. Unas 4 horas después del desove ya pueden distinguirse los huevos fecundados de los no fecundados (3). Para ello, se colocan los huevos y las larvas en recipientes de ensayo pequeños y se estudian al microscopio.

Las condiciones de ensayo aplicables a las primeras fases de la vida figuran en el apéndice 2. Los valores óptimos de pH y dureza del agua de dilución son de 7,8 y de 250 mg $CaCO_3$/l, respectivamente.

CÁLCULOS Y ESTADÍSTICAS

Se propone un procedimiento en dos etapas. En primer lugar, se hace un análisis estadístico de los datos relativos a la mortalidad, las anomalías en el desarrollo y el momento de la eclosión. A continuación, se hace una evaluación estadística de la longitud corporal de los peces con las concentraciones a las que no se haya observado ningún efecto adverso sobre esos tres parámetros. Se recomienda proceder así porque las sustancias tóxicas pueden matar selectivamente a los peces más pequeños, retrasar el momento de la eclosión e inducir malformaciones macroscópicas, lo cual puede sesgar las mediciones de longitud. Además de ello, la cantidad de peces por medir con cada tratamiento será más o menos la misma, lo cual garantiza la validez del análisis estadístico del ensayo.

▼B

DETERMINACIÓN DE LA $CL_{50}$ Y LA $EC_{50}$

Se calcula el porcentaje de huevos y larvas supervivientes y se corrige en función de la mortalidad en los controles mediante la fórmula de Abbott (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100\right)$$

donde:

P = porcentaje de supervivientes corregido,

P' = porcentaje de supervivientes observado en la concentración de ensayo,

C = porcentaje de supervivientes en los controles.

Si es posible, la $Cl_{50}$ se determina por un método apropiado al final del ensayo.

Si se desea incluir las anomalías morfológicas en el tratamiento estadístico de la $EC_{50}$ pueden encontrarse indicaciones al respecto en el artículo de Stephan (5).

ESTIMACIÓN DE LA LOEC Y LA NOEC

Uno de los objetivos del ensayo con huevos y alevines es comparar los lotes sometidos a concentraciones positivas con los controles para determinar la LOEC, para lo cual habrá que emplear métodos de comparaciones múltiples (6) (7) (8) (9) (10).

REFERENCIAS

(l) Laale H.W. (1977) The Biology and Use of the Zebrafish *(Brachyianio rerio)* in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, 121-173.

(2) Hisaoka K.K. y Battle H.L. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brazhydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) I. Morph., 102, pp. 311.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology. 2. pp. 173-181.

(4) Finney D.J. (1971). Probit Analysis, 3ª ed., Cambridge University Press, Gran Bretaña, pp. 1-333.

(5) Stephan CE. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J.G. Pearson, R.B. Foster y W.E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69-81.

(6) Dunnett C.W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp 1096-1121.

(7) Dunnett C.W. (1964) New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482-491.

(8) Williams D.A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, pp. 103-117.

(9) Williams D.A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, pp. 519-531.

(10) Sokal R.R. y Rohlf F.J. (1981). Biometry, the Principies and Practice of Statistics in Biological Research, W.H. Freeman and Co., San Francisco.

*Apéndice 2*

**CONDICIONES Y DURACIÓN DEL ENSAYO Y CRITERIOS DE SUPERVIVENCIA PARA LAS ESPECIES RECOMENDADAS**

| Especie | Temperaturea (ºC) | Salinidad (0/00) | Fotoperíodo (horas) | Duración de las fases (días) | | Duración habitual del ensayo | Supervivencia en los controles (% mínimo) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Embrión | Alevín | | Tasa de eclosiones satisfactorias | Tras la eclosión |
| Agua dulce | | | | | | | | |
| *Brachydanio rerio*<br>Pez cebra | 25 ±1 | — | 12-16 | 3-5 | 8-10 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (8-10 días) | 80 | 90 |
| *Onicorhynchus mykiss*<br>Trucha arco iris | 10 ± 1 ([1])<br>12 ± 1 ([2]) | — | 0 ([a]) | 30-35 | 25-30 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 20 días después de la eclosión (50-55 días) | 66 | 70 |
| *Cyprinus carpio*<br>Carpa común | 21-25 | — | 12-16 | 5 | > 4 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (8-9 días) | 80 | 75 |
| *Oryzias latipes*<br>Medaka | 24 ± 1 ([1])<br>23 ± 1 ([2]) | — | 12-16 | 8-11 | 4-8 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (13-16 días) | 80 | 80 |
| *Pimephales promelas*<br>Piscardo | 25 ± 2 | — | 16 | 4-5 | 5 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (8-9 días) | 60 | 70 |

([1]) Para los embriones.
([2]) Para las larvas.
([a]) Embriones y larvas en la oscuridad hasta una semana después de la eclosión, salvo durante las observaciones. Después, luz tenue hasta el final del ensayo.

▼B

*Apéndice 3*

**Condiciones y duración del ensayo y criterios de supervivencia para otras especies bien documentadas**

| Especie | Temperatura (°C) | Salinidat(0/00) | Fotoperíodo(horas) | Duración de las fases (días) | | Duración habitual del ensayo con embriones y alevines | Supervivencia en los controles (% minimo) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Embriones | Alevín | | Tasa de eclosiones satisfactorias | Tras la eclosión |
| AGUA DULCE | | | | | | | | |
| *Carassius auratus*<br>Carpa dorada | 24 ± 1 | — | — | 3 — 4 | > 4 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (7 días) | — | 80 |
| *Leopomis macrochirus*<br>Pez sol do agallas azules | 21 ± 1 | — | 16 | 3 | > 4 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4 días después de la eclosión (7 días) | — | 75 |
| AGUA SALADA | | | | | | | | |
| *Menidia peninsulae*<br>Pejerrey del Atlántico Occidental | 22-25 | 15-22 | 12 | 1,5 | 10 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 5 días después de la eclosión (6-7 días) | 80 | 60 |
| *Clupea harengus*<br>Arenque | 10 ± 1 | 8-15 | 12 | 20-25 | 3-5 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 3 días después de la eclosión (23-27 días) | 60 | 80 |
| *Gadus morhua*<br>Bacalao | 5 ± 1 | 5-30 | 12 | 14-16 | 3-5 | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 3 días después de la eclosión (18 días) | 60 | 80 |
| *Cyprinodon variegatus*<br>Petota | 25 ± 1 | 15-30 | 12 | — | — | Desde lo antes posible tras la fecundación (fase precoz de gástrula) hasta 4-7 días después de la eclosión (28 días) | > 75 | 80 |

▼B

*APÉNDICE 4*

**ALGUNAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE**

| Sustancia | Concentraciones |
|---|---|
| Materia en partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoniaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

▼B

## C.16. ENSAYO DE TOXICIDAD ORAL AGUDA EN ABEJAS

### 1. MÉTODO

El presente ensayo de toxicidad aguda reproduce las directrices del documento OCDE TG 213 (1998).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad consiste en un método de laboratorio diseñado para determinar la toxicidad oral aguda de los productos fitosanitanos y otros productos químicos en abejas obreras adultas.

Para determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia puede ser preciso estudiar la toxicidad oral aguda en abejas, por ejemplo, cuando es probable que estas queden expuestas a un producto químico determinado. El ensayo de toxicidad oral aguda se realiza para determinar la toxicidad inherente de los plaguicidas y otras sustancias para las abejas. Sus resultados se emplean para saber si es necesario profundizar en la evaluación. En particular, el método puede emplearse en programas de evaluación del peligro de los plaguicidas para las abejas, basados en una progresión secuencial desde los ensayos de toxicidad en laboratorio hasta los experimentos de semicampo y de campo (1). Los plaguicidas pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados.

Debe emplearse un tóxico de referencia para comprobar la sensibilidad de las abejas y la precisión del procedimiento de ensayo.

### 1.2. DEFINICIONES

**Toxicidad oral aguda:** efectos nocivos que se manifiestan durante un período máximo de 96 horas tras la administración oral de una dosis única de la sustancia de ensayo.

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo consumida. Se expresa en peso de la sustancia por animal de ensayo (μg/abeja). Dado que la alimentación es colectiva, no puede calcularse la dosis real por abeja, pero puede hacerse una estimación de la dosis media (sustancia de ensayo consumida en su totalidad/número de abejas en una jaula).

**$DL_{50}$ (dosis letal media) oral:** dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia que puede provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya administrado por vía oral. La $DL_{50}$ se expresa en μg de sustancia de ensayo por abeja. En el caso de los plaguicidas, la sustancia de ensayo puede ser un principio activo (p.a.) o un producto formulado que contenga uno o varios principios activos.

**Mortalidad:** número de animales muertos, es decir, completamente inmóviles.

### 1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se expone a las abejas obreras adultas *(Apis mellifera)* a una gama de dosis de la sustancia de ensayo dispersada en una solución de sacarosa. A continuación, se alimenta a las abejas de la misma forma, pero sin sustancia de ensayo. Se registra la mortalidad todos los días, al menos durante 48 horas, y se compara con las cifras del control. Si la tasa de mortalidad aumenta entre las 24 y las 48 horas y la mortalidad del control permanece a un nivel aceptable, es decir, $\leq$ 10 %, está indicado prolongar el ensayo hasta un máximo de 96 horas. Se analizan los resultados para calcular la $DL_{50}$ a las 24 y a las 48 horas y, en caso de que se haya prolongado el estudio, a las 72 y a las 96 horas.

▼B

1.4. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

— la mortalidad media del total de los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo,

— la $DL_{50}$ del tóxico de referencia debe ajustarse a la gama especificada.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Recolección de las abejas**

Deben emplearse ejemplares adultos jóvenes de abejas obreras de la misma raza, edad, alimentación, etc. Las abejas han de proceder de colonias sanas y bien alimentadas, a ser posible sin enfermedades y con reina, y con antecedentes y estado fisiológico conocidos. Pueden recolectarse la mañana del día en que vaya a realizarse el ensayo, o la víspera por la tarde y mantenerse en condiciones de ensayo hasta el día siguiente. Pueden emplearse abejas procedentes de cuadros sin cría, pero debe evitarse la recolección a principios de la primavera o a finales del otoño, pues en esas épocas las abejas modifican su fisiología. Si es preciso realizar el ensayo en esas épocas, las abejas pueden colocarse en una incubadora y criarse durante una semana con pan de abejas (polen tomado del panal) y solución de sacarosa. Si se utilizan abejas tratadas con productos químicos como antibióticos, anti-varroa, etc., antes de iniciar el ensayo de toxicidad habrá que esperar 4 semanas desde el final del último tratamiento.

1.5.2. **Alojamiento y alimentación**

Se emplean jaulas fáciles de limpiar, bien ventiladas, de cualquier material apropiado, como acero inoxidable, tela metálica, plástico, madera desechable, etc., y de tamaño apropiado, es decir, suficientemente espaciosas para el número de abejas. Es preferible colocar grupos de 10 abejas en cada jaula.

Las abejas se mantienen en la oscuridad en un cuarto de experimentación a 25 ± 2 °C. Debe registrarse a lo largo del ensayo la humedad relativa, que será por lo general del 50-70 %. Tanto el manejo como el tratamiento y las observaciones pueden realizarse con luz (del día). Se alimenta a las abejas con solución acuosa de sacarosa con una concentración final de 500 g/l (50 % w/v). Tras las dosis de ensayo, se las alimenta *ad libi-tum*. El sistema de alimentación debe permitir registrar la ingesta de cada jaula (véase el punto 1.6.3.1). Puede emplearse un tubo de vidrio de unos 50 mm de largo por 10 mm de ancho, con un extremo abierto de unos 2 mm de diámetro.

1.5.3. **Preparación de las abejas**

Se asignan las abejas de forma aleatoria a las jaulas, que se colocan, también de forma aleatoria, en el cuarto de experimentación.

▼B

Conviene suprimir la alimentación de las abejas 2 horas antes de iniciar el ensayo. Se recomienda esta práctica con el fin de que el contenido intestinal de todos los animales sea el mismo cuando comience el ensayo. Deben retirarse las abejas moribundas y sustituirse por otras sanas antes de empezar el ensayo.

1.5.4. **Preparación de las dosis**

Si la sustancia de ensayo puede mezclarse con agua, se añade directamente a una solución de sacarosa al 50 %. Si se trata de productos de calidad técnica o de sustancias escasamente solubles en agua, pueden emplearse disolventes orgánicos, emulgentes o dispersantes poco tóxicos para las abejas (por ejemplo, acetona, dimetilformamida o dimetilsulfóxido). La concentración del excipiente dependerá de la solubilidad de la sustancia de ensayo y ha de ser la misma para todas las concentraciones que se empleen en el ensayo. Por lo general, resulta adecuada una concentración de excipiente del 1 %, que no debe sobrepasarse.

Se preparan soluciones de control adecuadas, lo cual significa que, cuando se utilice un disolvente o dispersante para solubilizar la sustancia de ensayo, han de emplearse dos grupos de control distintos: una solución acuosa y una solución de sacarosa con el disolvente o excipiente a la concentración empleada en las dosis de ensayo.

1.6. PROCEDIMIENTO

1.6.1. **Grupos de ensayo y controles**

El número de dosis y pruebas en paralelo ha de ser suficiente desde el punto de vista estadístico para poder determinar la $DL_{50}$ con un límite de confianza del 95 %. Suele ser necesaria una serie geométrica de 5 dosis con un factor que no sobrepase el 2,2 y que incluya la gama de la $DL_{50}$. No obstante, el factor de dilución y el número de concentraciones han de determinarse con arreglo a la pendiente de la curva de toxicidad (dosis/mortalidad) y al método estadístico que se haya elegido para analizar los resultados. Las concentraciones apropiadas para el tratamiento pueden establecerse tras un experimento de determinación de gamas.

Con cada concentración de ensayo deben tratarse al menos 3 grupos en paralelo, de 10 abejas cada uno. Además de la serie de ensayo, deben efectuarse al menos 3 lotes de control, de 10 abejas cada uno. También deben efectuarse lotes de control para los disolventes/excipientes que se utilicen (véase el punto 1.5.4).

1.6.2. **Tóxico de referencia**

Debe incluirse un tóxico de referencia en la serie de ensayo. Se utilizarán al menos 3 dosis que abarquen la $DL_{50}$, prevista. Para cada dosis de ensayo se emplearán al menos 3 jaulas en paralelo, con 10 abejas cada una. El tóxico de referencia idóneo es el dimetoato, cuya $DL_{50}$-24 horas tras administración oral es del orden de 0,10-0,35 µg p.a./abeja (2). También pueden emplearse otros tóxicos si se dispone de datos suficientes para comprobar que la relación dosis/respuesta es la esperada (por ejemplo, paratión).

▼B

1.6.3. **Exposición**

1.6.3.1. *Administración de las dosis*

Debe administrarse a cada grupo de abejas 100-200 µl de solución acuosa de sacarosa al 50 % con la sustancia de ensayo a la concentración adecuada. Si la sustancia es poco soluble, poco tóxica o su concentración en la formulación es escasa, ha de administrarse un volumen mayor, pues se necesita una mayor cantidad de sustancia en la solución de sacarosa. Se controla la cantidad de alimento tratado que consume cada grupo. Una vez consumido el alimento (por lo general tras 3-4 horas), se retira el comedero de la jaula y se sustituye por otro con solución de sacarosa únicamente, que se proporciona *ad libitum*. El rechazo de la dosis de ensayo de algunos productos a concentraciones superiores puede dar lugar a un consumo escaso o nulo de alimento. Tras un máximo de 6 horas, el alimento tratado que no haya sido consumido se sustituye por solución de sacarosa sola. Se calcula el consumo de alimento tratado (por ejemplo, midiendo el volumen/peso del alimento tratado que haya sobrado).

1.6.3.2. *Duración*

Conviene que el ensayo dure hasta 48 horas después de la sustitución de la solución de ensayo por la de sacarosa sola. Si la mortalidad sigue aumentando en más del 10 % tras las primeras 24 horas, debe prolongarse el ensayo hasta un máximo de 96 horas, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

1.6.4. **Observaciones**

Se registra la mortalidad a las 4, las 24 y las 48 horas del inicio del ensayo (es decir, de la administración de la dosis). Si es necesario prolongar el período de observación, se harán registros cada 24 horas, hasta un máximo de 96 horas, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

Se calcula la cantidad de alimento consumido en cada grupo. Para saber si el alimento tratado es apetecible puede compararse el consumo de este y el de alimento sin tratar, durante un período de 6 horas.

Debe registrarse todo comportamiento anormal observado durante el período de ensayo.

1.6.5. **Ensayo límite**

En algunos casos (por ejemplo, cuando se piense someter a ensayo una sustancia escasamente tóxica), puede realizarse un ensayo límite con 100 µg p.a./abeja para demostrar que la $DL_{50}$ es superior a ese valor. Debe seguirse el mismo procedimiento, incluidos los 3 grupos de ensayo en paralelo, con la dosis de ensayo, los controles pertinentes, el tóxico de referencia y para el cálculo de la cantidad de alimento tratado que se ha consumido. Si mueren abejas debe realizarse un estudio completo. Deben registrarse los efectos subletales, en caso de producirse (véase el punto 1.6.4).

▼B

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. RESULTADOS

Se resumen los resultados en un cuadro que recoja, para cada grupo tratado, grupo de control y grupo con el tóxico de referencia, el número de abejas empleadas, la mortalidad en cada una de las observaciones y el número de abejas que presenten alteraciones del comportamiento. Se analizan los datos relativos a la mortalidad con métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, análisis por probitas, media móvil, probabilidad bino-mial) (3) (4). Se trazan las curvas de dosis-respuesta correspondientes a todas las observaciones recomendadas y se calculan las pendientes de las mismas y las dosis letales medias ($DL_{50}$) con un límite de confianza del 95 %. La mortalidad de los controles puede corregirse mediante la corrección de Abbott (4) (5). Si el alimento tratado no se ha consumido en su totalidad, se calcula la cantidad de sustancia de ensayo consumida en cada grupo. La $DL_{50}$ se expresa en μg de sustancia de ensayo por abeja.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes (estabilidad en el agua, presión de vapor, etc.),

— identificación química: fórmula estructural, pureza, etc. (en el caso de los plaguicidas, identidad y concentración del principio o principios activos).

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— denominación científica, raza, edad aproximada (en semanas), método y fecha de recolección,

— información sobre las colonias de donde proceden las abejas de ensayo: estado de salud, enfermedades de los sujetos adultos, tratamientos previos, etc.

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— temperatura y humedad relativa en el cuarto de experimentación,

— condiciones de alojamiento, incluido el tipo, tamaño y material de las jaulas,

— método de preparación de la solución madre y de ensayo (en su caso, el disolvente y su concentración),

— diseño del ensayo, por ejemplo, número de concentraciones y concentraciones de ensayo, número de controles, etc.,

— para cada concentración de ensayo y control, número de jaulas utilizadas en paralelo y número de abejas por jaula, fecha del ensayo.

▼B

2.2.4. **Resultados:**

— resultados del estudio previo de determinación de gamas, si procede,

— datos en bruto: mortalidad con cada dosis de ensayo en cada período de observación,

— gráfico de las curvas de dosis-respuesta al final del ensayo,

— valores de la $DL_{50}$ con un límite de confianza del 95 % en cada período de observación recomendado, con la sustancia de ensayo y el tóxico de referencia,

— métodos estadísticos empleados para calcular la $DL_{50}$,

— mortalidad en los controles,

— otros efectos biológicos observados o medidos en las abejas, como alteraciones del comportamiento (incluido el rechazo de la sustancia de ensayo), tasa de consumo del alimento tratado y sin tratar, etc.,

— toda desviación de los protocolos de ensayo aquí descritos y cualquier otra información de interés.

3. **REFERENCIAS**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N.1, 151-165. Marzo de 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera L.)* 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, 119-125.

(3) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour, Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3ª ed., Cambridge, Londres y Nueva York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, 265-267.

▼B

## C.17. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA POR CONTACTO EN ABEJAS

### 1. MÉTODO

El presente ensayo de toxicidad aguda reproduce las directrices del documento OCDE TG 214 (1998).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El presente ensayo de toxicidad consiste en un método de laboratorio diseñado para determinar la toxicidad aguda por contacto de los productos fitosanitarios y otros productos químicos en abejas obreras adultas.

Para determinar y evaluar las características tóxicas de una sustancia puede ser preciso estudiar la toxicidad aguda por contacto en abejas, por ejemplo, cuando es probable que estas queden expuestas a un producto químico determinado. El ensayo de toxicidad aguda por contacto se realiza para determinar la toxicidad inherente de los plaguicidas y otras sustancias para las abejas. Sus resultados se emplean para saber si es necesario profundizar en la evaluación. En particular, el método puede emplearse en programas de evaluación del peligro de los plaguicidas para las abejas, basados en una progresión secuencial desde los ensayos de toxicidad en laboratorio hasta los experimentos de semicampo y de campo (1). Los plaguicidas pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados.

Debe emplearse un tóxico de referencia para comprobar la sensibilidad de las abejas y la precisión del procedimiento de ensayo.

### 1.2. DEFINICIONES

**Toxicidad aguda por contacto:** efectos nocivos que se manifiestan durante un período máximo de 96 horas tras la aplicación tópica de una dosis única de una sustancia.

**Dosis:** cantidad de sustancia de ensayo aplicada. Se expresa en peso de la sustancia por animal de ensayo (µg/abeja).

**$DL_{50}$ (dosis letal media) por contacto:** dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia que puede provocar la muerte del 50 % de los animales a los que se haya aplicado. La $DL_{50}$ se expresa en µg de sustancia de ensayo por abeja. En el caso de los plaguicidas, la sustancia de ensayo puede ser un principio activo (p.a.) o un producto formulado que contenga uno o varios principios activos.

**Mortalidad:** número de animales muertos, es decir, completamente inmóviles.

### 1.3. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se expone a las abejas obreras adultas *(Apis mellifera),* por aplicación directa en el tórax (gotitas), a una gama de dosis de la sustancia de ensayo disuelta en un excipiente adecuado. El ensayo dura 48 horas. Si la tasa de mortalidad aumenta entre las 24 y las 48 horas y la mortalidad del control permanece a un nivel aceptable, es decir, <10 %, está indicado prolongar el ensayo hasta un máximo de 96 horas. Se registra la mortalidad todos los días y se compara con las cifras del control. Se analizan los resultados para calcular la $DL_{50}$ a las 24 y a las 48 horas y, en caso de que se haya prolongado el estudio, a las 72 y a las 96 horas.

▼B

1.4. VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

— la mortalidad media del total de los controles no ha de superar el 10 % al final del ensayo,

— la $DL_{50}$ del tóxico de referencia debe ajustarse a la gama especificada.

1.5. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.5.1. **Recolección de las abejas**

Deben emplearse ejemplares adultos jóvenes de abejas obreras de la misma raza, edad, alimentación, etc. Las abejas han de proceder de colonias sanas y bien alimentadas, a ser posible sin enfermedades y con reina, y con antecedentes y estado fisiológico conocidos. Pueden recolectarse la mañana del día en que vaya a reali-zarse el ensayo, o la víspera por la tarde y mantenerse en condiciones de ensayo hasta el día siguiente. Pueden emplearse abejas procedentes de cuadros sin cría, pero debe evitarse la recolección a principios de la primavera o finales del otoño, pues en esas épocas las abejas modifican su fisiología. Si es preciso realizar el ensayo en esas épocas, las abejas pueden colocarse en una incubadora y criarse durante una semana con pan de abejas (polen tomado del panal) y solución de sacarosa. Si se utilizan abejas tratadas con productos químicos como antibióticos, anti-varroa, etc., antes de iniciar el ensayo de toxicidad habrá que esperar 4 semanas desde el final del último tratamiento.

1.5.2. **Alojamiento y alimentación**

Se emplean jaulas fáciles de limpiar, bien ventiladas, de cualquier material apropiado, como acero inoxidable, tela metálica, plástico, madera desechable, etc., y de tamaño apropiado, es decir, suficientemente espaciosas para el número de abejas. Es preferible colocar grupos de 10 abejas en cada jaula.

Las abejas se mantienen en la oscuridad en un cuarto de experimentación a 25 ± 2 °C Debe registrarse a lo largo del ensayo la humedad relativa, que será por lo general del 50-70 %. Tanto el manejo como el tratamiento y las observaciones pueden realizarse con luz (del día). Se alimenta a las abejas con solución acuosa de sacarosa con una concentración final de 500 g/l (50 % w/v). Esta se proporciona *ad libitum* mientras dure el ensayo en un comedero de abejas, que puede ser un tubo de vidrio de unos 50 mm de largo por 10 mm de ancho, con un extremo abierto de unos 2 mm de diámetro.

1.5.3. **Preparación de las abejas**

Antes de aplicar la sustancia de ensayo, pueden anestesiarse las abejas con anhídrido carbónico o nitrógeno. Debe reducirse al mínimo la cantidad de anestésico aplicado y el tiempo de exposición. Se retiran las abejas moribundas y se sustituyen por otras sanas antes de empezar el ensayo.

1.5.4. **Preparación de las dosis**

La sustancia de ensayo se diluye en un excipiente, que puede ser un disolvente orgánico o una solución acuosa con un humectante. La acetona es el disolvente orgánico más conveniente, si bien pueden emplearse otros escasamente tóxicos para las abejas (por ejemplo, dimetilformamida o dimetilsulfóxido). Si se trata de formulados dispersados en agua o de sustancias orgánicas de gran polaridad insolubles en disolventes orgánicos, puede resultar más fácil aplicarlos en una solución débil de un humectante de una marca comercial (Agral, Cittowett, Lubrol, Triton, Tween, etc.).

▼B

Se preparan soluciones de control adecuadas, lo cual significa que, cuando se utilice un disolvente o dispersante para solubilizar la sustancia de ensayo, han de emplearse dos grupos de control distintos: uno con agua y otro con disolvente/dispersante.

1.6. PROCEDIMIENTO

1.6.1. **Grupos de ensayo y controles**

El número de dosis y pruebas en paralelo ha de ser suficiente desde el punto de vista estadístico para poder determinar la $DL_{50}$ con un límite de confianza del 95 %. Suele ser necesaria una serie geométrica de 5 dosis con un factor que no sobrepase el 2,2 y que incluya la gama de la $DL_{50}$. No obstante, el número de concentraciones ha de determinarse con arreglo a la pendiente de la curva de toxicidad (dosis/mortalidad) y al método estadístico que se haya elegido para analizar los resultados. Las concentraciones apropiadas para el tratamiento pueden establecerse tras un experimento de determinación de gamas.

Con cada concentración de ensayo deben tratarse al menos 3 grupos en paralelo, de 10 abejas cada uno.

Además de la serie de ensayo, deben efectuarse al menos 3 lotes de control, de 10 abejas cada uno. En su caso, deben hacerse 3 lotes de control adicionales, de 10 abejas cada uno, con el disolvente orgánico o humectante.

1.6.2. **Tóxico de referencia**

Debe incluirse un tóxico de referencia en la serie de ensayo. Se utilizarán al menos 3 dosis que abarquen la $DL_{50}$ prevista. Para cada dosis de ensayo se emplearán al menos 3 jaulas en paralelo, con 10 abejas cada una. El tóxico de referencia idóneo es el dimetoato, cuya $DL_{50}$-24 horas por contacto es del orden de 0,10-0,35μg p.a./abeja (2). También pueden emplearse otros tóxicos si se dispone de datos suficientes para comprobar que la relación dosis/respuesta es la esperada (por ejemplo, paratión).

1.6.3. **Exposición**

1.6.3.1. *Administración de las dosis*

Se hace una aplicación local a cada una de las abejas anestesiadas. Las abejas se asignan de forma aleatoria para las distintas dosis de ensayo y los controles. Con un microaplicador, se aplica a cada abeja en la cara dorsal del tórax 1 μl de solución con sustancia de ensayo a la concentración adecuada. Si procede, pueden aplicarse otros volúmenes. Después de la aplicación, se colocan las abejas en las jaulas de ensayo y se les proporciona solución de sacarosa.

1.6.3.2. *Duración*

Conviene que el ensayo dure 48 horas. Si la mortalidad sigue aumentando en más del 10 % entre las 24 y las 48 horas, debe prolongarse el ensayo hasta un máximo de 96 horas, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

▼B

1.6.4. **Observaciones**

Se registra la mortalidad a las 4, las 24 y las 48 horas de la administración de la dosis. Si es necesario prolongar el período de observación, se harán registros cada 24 horas, hasta un máximo de 96 horas, siempre y cuando la mortalidad del control no supere el 10 %.

Debe registrarse todo comportamiento anormal observado durante el período de ensayo.

1.6.5. **Ensayo límite**

En algunos casos (por ejemplo, cuando se piense someter a ensayo una sustancia escasamente tóxica), puede realizarse un ensayo límite con 100 μg p.a./abeja para demostrar que la $DL_{50}$ es superior a ese valor. Debe seguirse el mismo procedimiento, incluidos los 3 grupos de ensayo en paralelo, con la dosis de ensayo, los controles pertinentes y el tóxico de referencia. Si mueren abejas debe realizarse un estudio completo. Deben registrarse los efectos subletales, en caso de producirse (véase el punto 1.6.4).

2. **RESULTADOS E INFORME**

2.1. RESULTADOS

Se resumen los resultados en un cuadro que recoja, para cada grupo tratado, grupo de control y grupo con el tóxico de referencia, el número de abejas empleadas, la mortalidad en cada una de las observaciones y el número de abejas que presenten alteraciones del comportamiento. Se analizan los datos relativos a la mortalidad con métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, análisis por probitas, media móvil, probabilidad bino-mial) (3) (4). Se trazan las curvas de dosis-respuesta correspondientes a todas las observaciones recomendadas (a las 24, 48 y, en su caso, 72 horas y 96 horas) y se calculan las pendientes de las mismas y las dosis letales medias ($DL_{50}$) con un límite de confianza del 95 %. La mortalidad de los controles puede corregirse mediante la corrección de Abbott (4) (5). La $DL_{50}$, se expresa en μg de sustancia de ensayo por abeja.

2.2. INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

2.2.1. **Sustancia de ensayo:**

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (estabilidad en el agua, presión de vapor, etc.),

— identificación química: fórmula estructural, pureza, etc. (en el caso de los plaguicidas, identidad y concentración del principio o principios activos).

2.2.2. **Especie sometida a ensayo:**

— denominación científica, raza, edad aproximada (en semanas), método y fecha de recolección,

— información sobre las colonias de donde proceden las abejas de ensayo: estado de salud, enfermedades de los sujetos adultos, tratamientos previos, etc.

▼B

2.2.3. **Condiciones de ensayo:**

— temperatura y humedad relativa en el cuarto de experimentación,

— condiciones de alojamiento, incluido el tipo, tamaño y material de las jaulas,

— método de administración de la sustancia de ensayo: disolvente, volumen de solución de ensayo, anestésicos empleados, etc.,

— diseño del ensayo, por ejemplo, número de concentraciones y concentraciones de ensayo, número de controles, etc.; para cada concentración de ensayo y control, número de jaulas utilizadas en paralelo y número de abejas por jaula,

— fecha del ensayo.

2.2.4. **Resultados:**

— resultados del estudio previo de determinación de gamas, si procede,

— datos en bruto: mortalidad con cada concentración de ensayo en cada período de observación,

— gráfico de las curvas de dosis-respuesta al final del ensayo,

— valores de la $DL_{50}$ con un límite de confianza del 95 % en cada período de observación recomendado, con la sustancia de ensayo y el tóxico de referencia,

— métodos estadísticos empleados para calcular la $DL_{50}$,

— mortalidad en los controles,

— otros efectos biológicos observados o medidos en las abejas, así como cualquier reacción anormal,

— toda desviación de los protocolos de ensayo aquí descritos y cualquier otra información de interés.

3. **REFERENCIAS**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products — Honeybees. EPPO bulletin, vol. 23, N. 1, 151-165. Marzo de 1993.

(2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees *(Apis mellifera L.* ,1981-1992. Journal of Apicultural Research 22119-125.

(3) Litchfield, J.T. y Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(4) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3ª ed., Cambridge, Londres y Nueva York.

(5) Abbott, W.S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. jour. Econ. Entomol. 18, 265-267.

▼B

## C.18. ADSORCIÓN/DESORCIÓN SEGÚN UN MÉTODO DE EQUILIBRIO POR LOTES

### 1. MÉTODO

Este método reproduce las directrices de la OCDE TG 106 para la determinación de la adsorción/desorción en el suelo, según un método de equilibrio por lotes (2000).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El método tiene en cuenta una prueba de anillo y un taller para la selección de suelo con vistas al desarrollo de una prueba de adsorción (1) (2) (3) (4), así como distintas directrices nacionales vigentes (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11).

Los estudios de adsorción/desorción son útiles para proporcionar información esencial sobre la movilidad de las sustancias químicas y su distribución en los compartimentos edáfico, acuático y aéreo de la biosfera (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21). Esta información puede ser utilizada en la predicción o estimación, por ejemplo, de la capacidad de una sustancia química para su degradación (22) (23), transformación y absorción por organismos (24), lixiviación a través del perfil edáfico (16) (18) (19) (21) (25) (26) (27) (28), volatilidad desde el suelo (21) (29) (30) o arrastre desde la tierra hasta las aguas naturales (18) (31) (32). Los datos de adsorción pueden utilizarse para establecer comparaciones y modelos (19) (33) (34) (35).

La distribución de una sustancia química entre las fases edáfica y acuosa es un proceso complejo que depende de diversos factores: la naturaleza química de la sustancia (12) (36) (37) (38) (39) (40), las características del suelo (4) (12) (13) (14) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) y factores climáticos tales como las precipitaciones, la temperatura, la luz solar y el viento. Así pues, los numerosos fenómenos y mecanismos implicados en el proceso de adsorción de una sustancia química por el suelo no pueden definirse completamente con un modelo simplificado de laboratorio como es el presente método. Sin embargo, esta tentativa, aunque no puede cubrir todos los casos ambientalmente posibles, proporciona información valiosa sobre la importancia ambiental de la adsorción de una sustancia química.

Véase también la Introducción general.

### 1.2. OBJETO

El objeto del método es estimar el comportamiento de adsorción/desorción de una sustancia en los suelos. Lo que se pretende es obtener un valor de sorción que pueda utilizarse para predecir el reparto en diversas condiciones ambientales; con este fin, se determinan los coeficientes de adsorción en el equilibrio de una sustancia química en diversos suelos en función de las características de estos (por ejemplo, contenido de carbono orgánico, contenido de arcilla y textura del suelo y pH). Hay que utilizar diversos tipos de suelo para cubrir lo más ampliamente posible las interacciones de una sustancia dada con suelos naturales.

En este método, la adsorción representa el proceso de enlace de una sustancia química a las superficies de los suelos; no se distingue entre diversos procesos de adsorción (adsorción física y química) y procesos tales como la degradación catalizada en superficie, la adsorción en la masa o las reacciones químicas. La adsorción que pueda darse en las partículas coloidales (diámetro < 0,2 μm) generadas por los suelos no se tiene en cuenta completamente.

▼B

Los parámetros del suelo que se consideran más importantes para la adsorción son los siguientes: contenido de carbono orgánico (3) (4) (12) (13) (14) (41) (43) (44) (45) (46) (47) (48); contenido de arcilla y textura del suelo (3) (4) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) y pH para los compuestos ionizables (3) (4) (42). Otros parámetros del suelo que pueden influir en la adsorción/desorción de determinadas sustancias son la capacidad efectiva de intercambio catiónico (ECEC), el contenido de óxidos amorfos de hierro y aluminio, particularmente en caso de suelos volcánicos y tropicales (4), y la superficie específica (49).

La prueba se diseña para evaluar la adsorción de una sustancia química en distintos tipos de suelo con una amplia gama de contenido de carbono orgánico, contenido de arcilla y textura del suelo, y pH. Comprende tres etapas:

**Etapa 1:** Estudio preliminar para determinar:

— la proporción suelo/solución,

— el tiempo de equilibrio para la adsorción y la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio,

— la adsorción de la sustancia problema en las superficies de los recipientes del ensayo y la estabilidad de dicha sustancia durante el período de prueba.

**Etapa 2:** Prueba de barrido: se estudia la adsorción en 5 tipos diversos de suelo mediante cinética de adsorción con una sola concentración y determinación del coeficiente de distribución $K_d$ y $K_{oc}$.

**Etapa 3:** Determinación de las isotermas de adsorción de Freundlich para determinar la influencia de la concentración sobre el grado de adsorción en los suelos.

Estudio de la desorción mediante cinética de desorción/isotermas de desorción de Freundlich (apéndice 1).

1.3. DEFINICIONES Y UNIDADES

| Símbolo | Definición | Unidad |
|---|---|---|
| $A_{t_i}$ | Adsorción porcentual al tiempo $t_i$ | % |
| $A_{eq}$ | Adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción | % |
| $m_s^{ads}(t_i)$ | Masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo al tiempo $t_i$ | µg |
| $m_s^{ads}(\Delta t_i)$ | Masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo durante el intervalo de tiempo $\Delta t_i$ | µg |
| $m_s^{ads}(eq)$ | Masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción | µg |
| $m_0$ | Masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al principio de la prueba de adsorción | µg |
| $m_m^{ads}(t_i)$ | Masa de la sustancia problema medida en una alícuota ($v_a^A$) al tiempo $t_i$ | µg |
| $m_{aq}^{ads}(eq)$ | Masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción | µg |
| $m_{soil}$ | Cantidad de la fase edáfica, expresada en masa seca de suelo | g |

▼B

| Símbolo | Definición | Unidad |
|---|---|---|
| $C_{st}$ | Concentración en masa de la solución madre de la sustancia | µg $cm^{-3}$ |
| $C_0$ | Concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo | µg $cm^{-3}$ |
| $C_{aq}^{ads}(t_i)$ | Concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa al tiempo $t_i$ en que se realiza el análisis | µg $cm^{-3}$ |
| $C_s^{ads}(eq)$ | Contenido de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción | µg $g^{-1}$ |
| $C_{aq}^{ads}(eq)$ | Concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de adsorción | µg $cm^{-3}$ |
| $V_0$ | Volumen inicial de la fase acuosa en contacto con el suelo durante la prueba de adsorción | $cm^3$ |
| $v_a^A$ | Volumen de la alícuota en que se mide la sustancia problema | $cm^3$ |
| $K_d$ | Coeficiente de distribución de la adsorción | $cm^{-3}$ $g^{-1}$ |
| $K_{oc}$ | Coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico | $cm^3$ |
| $K_{om}$ | Coeficiente de distribución, normalizado para tener en cuenta la materia orgánica | $cm^3 g^{-1}$ |
| $K_F^{ads}$ | Coeficiente de adsorción de Freundlich | $-1/n$ ($cm^3$) $1/n$ $g^{-1}$ |
| l/n | Exponente de Freundlich | |
| $D_{t_i}$ | Desorción porcentual al tiempo $t_i$ | % |
| $D_{\Delta t_i}$ | Desorción porcentual en el intervalo de tiempo $\Delta t_i$ | % |
| $K_{des}$ | Coeficiente de desorción aparente | $cm^3$ |
| $K_F^{des}$ | Coeficiente de desorción de Freundlich | µg $^{-1}$ ($cm^3$) $1/ng^{-1}$ |
| $m_{aq}^{des}(t_i)$ | Masa de la sustancia problema desorbida del suelo al tiempo $t_i$ | µg |
| $m_m^{des}(\Delta t_i)$ | Masa de la sustancia problema desorbida del suelo durante el intervalo de tiempo $\Delta t_i$ | µg |
| $m_m^{des}(eq)$ | Masa de la sustancia determinada analíticamente en la fase acuosa en el equilibrio de desorción | µg |
| $m_{aq}^{des}(eq)$ | Masa total de la sustancia problema desorbida en el equilibrio de desorción | µg |
| $m_s^{des}(\Delta t_i)$ | Masa de la sustancia que permanece adsorbida en el suelo después del intervalo de tiempo $\Delta t_i$ | µg |
| $m_{aq}^A$ | Masa de la sustancia que queda en solución después de alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen | µg |
| $C_s^{des}(eq)$ | Contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción | µg $g^{-1}$ |

▼B

| Símbolo | Definición | Unidad |
|---|---|---|
| $C_{aq}^{des}(eq)$ | Concentración en masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio de desorción | $\mu g\ cm^{-3}$ |
| $v_T$ | Volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante el experimento de cinética de desorción llevado a cabo con el método en serie | $cm^3$ |
| $v_R$ | Volumen del sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de $CaCl_2$0,01 M | $cm^3$ |
| $v_a^D$ | Volumen de la alícuota tomada para el análisis a partir del tiempo (i), durante el experimento de cinética de desorción realizado con el método en serie | $cm^3$ |
| $V_{ra}i^D$ | Volumen de la solución tomada del tubo (i) para la medida de la sustancia problema, en el experimento de cinética de desorción (método paralelo) | $cm^3$ |
| $V_r^F$ | Volumen de la solución tomada del tubo para la medida de la sustancia problema, en el equilibrio de desorción | $cm^3$ |
| MB | Balance de masa | % |
| $m_E$ | Masa total de la sustancia problema extraída del suelo y de las paredes del recipiente del ensayo en dos pasos | µg |
| $V_{rec}$ | Volumen del sobrenadante recuperado después del equilibrio de adsorción | $cm^3$ |
| $p_{ow}$ | Coeficiente de reparto octanol/agua | |
| pKa | Constante de disociación | |
| $S_w$ | Hidrosolubilidad | $gl^{-1}$ |

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

A las muestras de suelo de peso seco conocido que se han preequilibrado en $CaCl_2$0,01 M se añaden volúmenes conocidos de soluciones de concentración también conocida de la sustancia problema, no marcada ni radiomarcada, en $CaCl_2$0,01 M. La mezcla se agita durante un tiempo adecuado. Las suspensiones de suelo se separan entonces por centrifugación y, si se desea, por filtración, y se analiza la fase acuosa. La cantidad de sustancia problema adsorbida en la muestra de suelo se calcula como la diferencia entre la cantidad de sustancia problema inicialmente presente en la solución y la cantidad que permanece al final del experimento (método indirecto).

Como opción, la cantidad de sustancia problema adsorbida puede determinarse también directamente por análisis del suelo (método directo). Este procedimiento, que implica someter el suelo a extracción gradual con el solvente apropiado, se recomienda en caso de que no pueda determinarse exactamente la diferencia de concentración de la sustancia en la solución. Los siguientes son ejemplos de tales casos: adsorción de la sustancia problema en la superficie de los recipientes del ensayo, inestabilidad de la sustancia problema en la escala de tiempo del experimento, adsorción débil que dé solamente un pequeño cambio de concentración en la solu-ción, y adsorción fuerte que deje una concentración tan baja que no pueda determinarse exactamente. Si se utiliza una sustancia radiomarcada, la extracción del suelo puede evitarse mediante análisis de la fase edáfica por combustión y recuento de centelleo líquido. Sin embargo, el recuento de centelleo líquido es una técnica inespecífica que no puede distinguir entre productos parentales y productos de transformación; por lo tanto, debe utilizarse solamente si la sustancia problema es estable durante la duración del estudio.

▼B

1.5. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

Los reactivos químicos deben ser de grado analítico. Se recomienda el uso de sustancias problema no marcadas de composición conocida y pureza preferiblemente del 95 %, al menos, o de sustancias problema radio-marcadas de composición y radiopureza conocidas. En caso de marcadores de semivida breve, deben aplicarse correcciones para tener en cuenta su desintegración.

Antes de llevar a cabo una prueba de adsorción/desorción, debe disponerse de la siguiente información sobre la sustancia problema:

a) hidrosolubilidad (A.6);

b) presión de vapor (A.4) o constante de la ley de Henry;

c) degradación abiótica: hidrólisis en función del pH (C.7);

d) coeficiente de reparto (A.8);

e) biodegradabilidad fácil (C.4) o transformación aerobia y anaerobia en el suelo;

f) pKa de las sustancias ionizables;

g) fotólisis directa en agua (es decir, espectro de absorción ultravioleta-visible en el agua, rendimiento cuántico) y fotodegradación en el suelo.

1.6. APLICABILIDAD DE LA PRUEBA

La prueba es aplicable a las sustancias químicas respecto de las cuales se dispone de un método analítico con la suficiente exactitud. Un parámetro importante que puede influir en la fiabilidad de los resultados, especialmente cuando se sigue el método indirecto, es la estabilidad de la sustancia problema en la escala de tiempo de la prueba. Así pues, es necesario comprobar la estabilidad en un estudio preliminar; si se observa alguna transformación en la escala de tiempo de la prueba, se recomienda que el estudio principal se realice analizando tanto la fase edáfica como la acuosa.

Pueden surgir dificultades en la realización de esta prueba con sustancias problema cuya hidrosolubilidad sea baja ($S_w < 10^{-4}$ g $l^{-1}$), así como con sustancias muy cargadas, debido al hecho de que la concentración en la fase acuosa no puede medirse analíticamente con la suficiente exactitud. En estos casos hay que tomar medidas adicionales. En las secciones pertinentes del presente método se dan indicaciones sobre cómo tratar estos problemas.

Al probar sustancias volátiles, debe tenerse cuidado para evitar pérdidas durante el estudio.

1.7. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.7.1. **Instrumentos y reactivos químicos**

Equipo normal de laboratorio, especialmente el siguiente:

a) tubos o recipientes para llevar a cabo los experimentos. Es importante que estos tubos o recipientes:

— ajusten directamente en la centrifugadora para minimizar los errores de manipulación y transferencia,

— estén hechos de un material inerte que minimice la adsorción de la sustancia problema en su superficie;

▼B

b) dispositivo de agitación: agitador rotatorio o equipo equivalente: el dispositivo de agitación debe mantener el suelo en suspensión durante la agitación;

c) centrifugadora: preferiblemente de alta velocidad con, por ejemplo, fuerzas de centrifugación > 3 000 g, con temperatura controlada, capaces de retirar de la solución acuosa partículas con un diámetro mayor de 0,2 μm. Los recipientes deben estar cerrados durante la agitación y la centrifugación para evitar fenómenos de volatilidad y pérdidas de agua; para minimizar la adsorción sobre ellos, deben utilizarse tapones desactivados, tales como tapones de rosca con revestimiento de teflón;

d) opcional: dispositivo de filtración: filtros de 0,2 μm de porosidad, estériles, de un solo uso. Debe tenerse especial cuidado en la selección del material del filtro, a fin de evitar cualquier pérdida de la sustancia problema sobre él; para las sustancias problema poco solubles no se recomienda usar material orgánico;

e) instrumentación analítica, adecuada para medir la concentración de la sustancia problema;

f) estufa de laboratorio, capaz de mantener una temperatura de 103 a 110 $^{o}$C.

1.7.2. **Caracterización y selección de los suelos**

Los suelos deben caracterizarse por tres parámetros considerados en gran parte responsables de la capacidad de adsorción: carbono orgánico, contenido de arcilla y textura de suelo, y pH. Como ya se ha mencionado (véase el punto 1.2) la adsorción/desorción de ciertas sustancias puede verse afectada por otras propiedades fisicoquímicas del suelo, que deben considerarse en tales casos.

Los métodos utilizados para la caracterización de suelo son muy importantes y pueden tener una influencia significativa en los resultados. Por lo tanto, se recomienda que se mida el pH del suelo en una solución de $CaCl_2$0,01 M (que es la solución utilizada en la prueba de adsorción/desorción) según el método correspondiente de la ISO (por ejemplo, ISO-10390-1). También se recomienda que las otras propiedades pertinentes del suelo se determinen según métodos normalizados [por ejemplo, el Manual de análisis de suelo *(Handbook of Soil Analysis)]* de la ISO: esto permite que el análisis de los datos de sorción se base en parámetros del suelo normalizados en conjunto. En el punto 3, «Referencias» (50-52), se da información sobre métodos normalizados existentes de análisis y caracterización del suelo. Para el calibrado de los métodos de prueba del suelo, se recomienda el uso de suelos de referencia.

En el cuadro 1 se da información sobre la selección de suelos para los experimentos de adsorción/desorción. Los 7 suelos seleccionados cubren los tipos de suelo de las zonas geográficas templadas. En caso de sustancias problema ionizables, los suelos seleccionados deben cubrir una gama amplia de pH, para poder evaluar la adsorción de la sustancia en sus formas ionizada y no ionizada. En el punto 1.9, «Realización de la prueba», figuran orientaciones sobre cuántos suelos distintos han de utilizarse en las diversas fases de la prueba.

Si se prefieren otros tipos de suelo, deben caracterizarse por los mismos parámetros y ser similares a los descritos en el cuadro 1 en cuanto a la variación de sus propiedades, incluso aunque no se ajusten exactamente a los criterios.

▼B

*Cuadro 1*

**Información sobre la selección de muestras de suelo para los estudios de adsorción/desorción**

| Tipo de suelo | Gama de pH (en $CaCl_2$ 0,01 M) | Contenido de carbono orgánico (%) | Contenido de arcilla (%) | Textura del suelo (1) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 4,5 - 5,5 | 1,0 - 2,0 | 65-80 | Arcilla |
| 2 | > 7,5 | 3,5 - 5,0 | 20-40 | Franco-arcilloso |
| 3 | 5,5 - 7,0 | 1,5 - 3,0 | 15-25 | Franco-limoso |
| 4 | 4,0 - 5,5 | 3,0 - 4,0 | 15-30 | Franco |
| 5 | < 4,0 - 6,0 (2) | < 0,5 - 1,5 (2) (3) | < 10-15 (2) | Franco-arenoso |
| 6 | > 7,0 | < 0,5 - 1,0 (2) (3) | 40-65 | Franco-arcilloso/ arcilla |
| 7 | < 4,5 | > 10 | < 10 | Arena/franco-arenoso |

(1) Según el sistema de la FAO y los Estados Unidos de América (85).
(2) Las variables respectivas deben mostrar preferentemente valores dentro de la gama considerada. Si, no obstante, hay dificultades para encontrar material de suelo adecuado, se aceptarán valores por debajo del mínimo indicado.
(3) Los suelos con menos del 0,3 % de carbono orgánico pueden perturbar la correlación entre el contenido orgánico y la adsorción. Así pues, se recomienda el uso de suelos con un contenido mínimo de carbono orgánico del 0,3 %.

1.7.3. **Recogida y conservación de muestras de suelo**

1.7.3.1. *Recogida*

No se recomienda ninguna técnica o herramienta de muestreo específica; la técnica de muestreo depende del propósito del estudio (53) (54) (55) (56) (57) (58).

Deben considerarse los elementos siguientes:

a) es necesario tener información detallada sobre las circunstancias del yacimiento, incluyendo la situación, cubierta vegetal, tratamientos con plaguicidas y fertilizantes, adiciones biológicas o contaminación accidental. Deben seguirse las recomendaciones de la norma de la ISO sobre muestreo del suelo (ISO 10381-6) en cuanto a la descripción del sitio de muestreo;

b) hay que definir el sitio de muestreo por sus coordenadas UTM (proyección universal transversal de Merca-tor/cero geodésico horizontal europeo) o geográficas; así se puede volver a recoger en el futuro un suelo particular o definir el suelo bajo diversos sistemas de clasificación utilizados en países diferentes. Solamente debe recogerse el horizonte A hasta una profundidad máxima de 20 cm. Especialmente en el caso del suelo de tipo 7, si hay un horizonte $O_h$, presente como parte del suelo, debe incluirse en el muestreo.

Las muestras de suelo deben transportarse utilizando recipientes y bajo condiciones de temperatura que garanticen que no se alteran perceptiblemente las propiedades iniciales del suelo.

▼B

1.7.3.2. *Conservción*

Se prefiere el uso de suelos tomados recientemente del yacimiento. Solamente si esto no es posible, el suelo puede conservarse a temperatura ambiente y secado al aire. No se recomienda ningún límite de tiempo de conservación, pero los suelos almacenados durante más de 3 años deben volver a analizarse en cuanto a su contenido de carbono orgánico, pH y capacidad de intercambio catiónico (CEC), antes de que se utilicen.

1.7.3.3. *Manipulación y preparación de las muestras de suelo para la prueba*

Los suelos se secan al aire a temperatura ambiente (preferiblemente entre 20 y 25 $^{o}$C). La desagregación debe llevarse a cabo con la fuerza mínima, de modo que la textura original del suelo cambie lo menos posible. Los suelos se tamizan a un tamaño de partícula ≤ 2 mm; deben seguirse las recomendaciones de la norma de la ISO sobre muestreo de suelo (ISO 10381-6) en cuanto al proceso de tamizado. Se recomienda una homoge-neización cuidadosa, ya que aumenta la reproducibilidad de los resultados. El índice de humedad de cada suelo se determina en tres alícuotas mediante calentamiento a 105 $^{o}$C hasta que no haya ningún cambio significativo en el peso (aproximadamente 12 horas). Para todos los cálculos, la masa del suelo hace referencia a la masa seca en estufa, es decir, el peso del suelo corregido para descontar el índice de humedad.

1.7.4. **Preparación de la sustancia problema para su aplicación al suelo**

La sustancia problema se disuelve en una solución de $CaCl_2$0,01 M en agua destilada o desionizada; la solución de $CaCl_2$ se utiliza como fase solvente acuosa para mejorar la centrifugación y minimizar el intercambio catiónico. La concentración de la solución madre debe ser preferiblemente 3 órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico utilizado. Este umbral garantiza la exactitud de las medidas en cuanto a la metodología seguida en este método; además, la concentración de la solución madre debe estar por debajo de la hidrosolubilidad de la sustancia problema.

La solución madre debe prepararse de preferencia justo antes de la aplicación a las muestras de suelo y debe guardarse cerrada en la oscuridad a 4 $^{o}$C. El tiempo de conservación depende de la estabilidad de la sustancia problema y de su concentración en la solución.

Solamente en el caso de las sustancias poco solubles ($S_w < 10^{-4}$ g $l^{-1}$), puede ser necesario añadir un agente de solubilización apropiado cuando sea difícil disolver la sustancia problema. Este agente de solubilización: a) debe ser miscible con agua, como el metanol o el acetonitrilo; b) su concentración no debe exceder del 1 % del volumen total de la solución madre y debe constituir menos de ese límite en la solución de la sustancia problema que se vaya a poner en contacto con el suelo (preferentemente menos del 0,1 %), y c) no debe ser un agente tensoactivo ni experimentar reacciones solvolíticas con la sustancia problema. El uso de un agente de solubilización debe constar y justificarse en el informe sobre los datos.

Otra opción para sustancias poco solubles es añadir al sistema de prueba sustancia problema ya disuelta: esta sustancia se disuelve en un solvente orgánico, del cual se añade una alícuota al sistema de suelo y solución de $CaCl_2$0,01 M en agua destilada o desionizada. El contenido del solvente orgánico en la fase acuosa debe mantenerse lo más bajo posible, normalmente sin exceder del 0,1 %. La utilización de un solvente orgánico puede adolecer de irreproducibilidad del volumen. Así pues, puede introducirse un error adicional ya que la concentración de sustancia problema y de cosolvente no será la misma en todas las pruebas.

▼B

1.8. REQUISITOS PREVIOS PARA LLEVAR A CABO LA PRUEBA DE ADSORCIÓN/DESORCIÓN

1.8.1. **Método analítico**

Entre los parámetros clave que pueden influir en la exactitud de las medidas de sorción se incluyen la exactitud del método analítico en el análisis de las fases tanto de solución como adsorbida, la estabilidad y la pureza de la sustancia problema, el logro del equilibrio de sorción, la magnitud del cambio de concentración de la solución, la proporción suelo/solución y los cambios en la estructura del suelo durante el proceso de equilibrado (35) (59) (60) (61) (62). En el apéndice 2 figuran algunos ejemplos donde se tratan estos problemas de exactitud.

Debe comprobarse la fiabilidad del método analítico utilizado en la gama de concentración que pueda darse durante la prueba. El experimentador debe ser libre para elaborar un método apropiado con la exactitud, la precisión, la reproducibilidad, los límites de detección y la recuperación apropiados. A continuación se dan orientaciones sobre cómo llevar a cabo tal prueba.

Un volumen apropiado de $CaCl_2$0,01 M (por ejemplo, 100 $cm^3$) se agita durante 4 horas con un peso determinado de suelo (por ejemplo, 20 g) de alta capacidad de adsorción, es decir, con un alto contenido de carbono orgánico y de arcilla; estos pesos y volúmenes pueden variar dependiendo de las necesidades analíticas, pero una proporción suelo/solución de 1:5 es un punto de partida conveniente. Se centrifuga la mezcla y puede filtrarse la fase acuosa. Se añade a esta cierto volumen de la solución madre de sustancia problema para alcanzar una concentración nominal dentro de la gama de concentración que pueda darse durante la prueba. Este volumen no debe exceder del 10 % del volumen final de la fase acuosa, para cambiar lo menos posible la naturaleza de la solución de preequilibrado. Se analiza la solución.

Debe realizarse una prueba en blanco con el sistema suelo + solución de $CaCl_2$ (sin la sustancia problema), para comprobar la presencia de artefactos en el método analítico y de efectos de matriz causados por el suelo.

Entre los métodos analíticos que pueden utilizarse para las medidas de sorción se incluyen la cromatografía gas-líquido (GLC), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la espectrometría (por ejemplo, cromatografía gaseosa/espectrometría de masas, HPLC/espectrometría de masas) y el recuento de centelleo líquido (para sustancias radiomarcadas). Sea cual sea el método analítico utilizado, se considera conveniente si la recuperación está entre el 90 y el 110 % del valor nominal. Para permitir la detección y la evaluación después de que haya tenido lugar el reparto, los límites de detección del método analítico deben estar al menos 2 órdenes de magnitud por debajo de la concentración nominal.

Las características y los límites de detección del método analítico disponible para llevar a cabo los estudios de adsorción desempeñan un papel importante en la definición de las condiciones de prueba y de la realización de todo el experimento. Este método sigue una vía experimental general y proporciona recomendaciones y orientaciones sobre soluciones alternativas cuando el método analítico y las instalaciones de laboratorio impongan limitaciones.

▼B

1.8.2. **Selección de las proporciones óptimas suelo/solución**

La selección de proporciones apropiadas suelo/solución para los estudios de sorción depende del coeficiente de distribución $K_d$ y del grado relativo de adsorción deseado. El cambio de concentración de la sustancia en la solución determina la exactitud estadística de la medida basada en la forma de la ecuación de adsorción y el límite de la metodología analítica, respecto a la detección de la concentración de la sustancia química en la solución. Por lo tanto, en la práctica general es útil partir de algunas proporciones fijadas, para las cuales el porcentaje adsorbido sea de más del 20 %, y preferiblemente > 50 % (62), mientras que debe tenerse cuidado para mantener bastante alta la concentración de sustancia problema en la fase acuosa a fin de poder medirla con exactitud. Esto es particularmente importante en caso de altos porcentajes de adsorción.

Un planteamiento conveniente de la selección de las proporciones adecuadas suelo/agua se basa en una estimación del valor de $K_d$ por estudios preliminares o por técnicas aceptadas de estimación (apéndice 3). La selección de una proporción adecuada puede entonces basarse en la gráfica de la proporción suelo/solución frente a Kd con porcentajes fijos de adsorción (figura 1). En esta gráfica se asume que la ecuación de adsorción es lineal ([1]). La relación aplicable se obtiene reordenando la ecuación (4) de Kd en la forma de la ecuación (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1\right) K_d \qquad (1)$$

o en su forma logarítmica suponiendo que $R = m_{soil}/V_0$ y $A_{eq}\,\%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log\left[\frac{A_{eq}\%/100}{1 - A_{eq}\%/100}\right] \qquad (2)$$

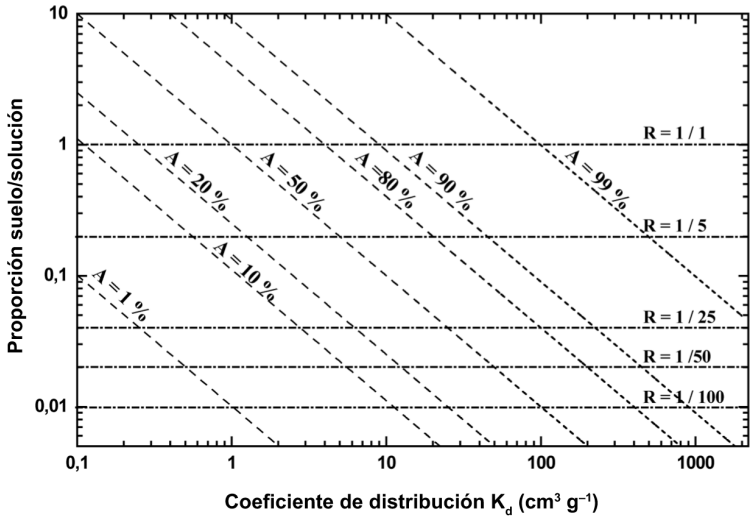



**Figura 1.** Relación entre las proporciones suelo/solución y $K_d$ con diversos porcentajes de adsorción de la sustancia problema

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

La figura 1 muestra las proporciones suelo/solución necesarias en función de $K_d$ para diversos niveles de adsorción. Por ejemplo, con una proporción suelo/solución de 1:5 y un $K_d$ de 20, habrá aproximadamente un 80 % de adsorción. Para obtener una adsorción del 50 % con el mismo $K_d$, debe utilizarse una proporción de 1:25. Este planteamiento de la selección de las proporciones suelo/solución adecuadas da al investigador la flexibilidad suficiente para satisfacer sus necesidades experimentales.

Los casos que son más difíciles de tratar son aquellos en que la sustancia química se adsorbe mucho o muy poco. En los casos en que se dé adsorción baja, se recomienda una proporción suelo/solución de 1:1, aunque con algunos tipos de suelo muy orgánico pueden ser necesarias proporciones más pequeñas para obtener una mezcla fluida. Debe tenerse cuidado con la metodología analítica para medir pequeños cambios en la concentración de la solución; si no, la medida de la adsorción será inexacta. Por otra parte, en caso de coeficientes de distribución $K_d$ muy altos, puede llegarse hasta una proporción suelo/solución de 1:100 para dejar una cantidad significativa de sustancia química en la solución. Sin embargo, debe tenerse cuidado para asegurar una buena mezcla, y dejarse tiempo suficiente para que el sistema se equilibre. Un planteamiento alternativo es predecir el valor de $K_d$ aplicando técnicas de estimación basadas, por ejemplo, en los valores de $P_{ow}$ (apéndice 3). Esto podría ser útil especialmente para las sustancias químicas poco adsorbidas/polares con $P_{ow} < 20$ y para las sustancias lipofílicas/de alta sorción con $P_{ow} > 10^4$.

1.9. REALIZACIÓN DE LA PRUEBA

1.9.1. Condiciones de la prueba

Todos los experimentos se hacen a temperatura ambiente y, si es posible, a una temperatura constante situada entre 20 y 25 $^oC$.

Las condiciones de la centrifugación permitirán eliminar de la solución las partículas de más de 0,2 μm. Este valor corresponde a la partícula más pequeña que se considera partícula sólida, y es el límite entre partículas sólidas y coloidales. En el apéndice 4 figuran orientaciones sobre cómo determinar las condiciones de la centrifugación.

Si el equipo de centrifugación no puede garantizar la eliminación de las partículas de más de 0,2 μm, puede utilizarse una combinación de centrifugación y de filtración con filtros de 0,2 μm. Estos filtros deben hacerse de un material inerte conveniente para evitar cualquier pérdida de la sustancia problema en ellos. En todo caso, debe demostrarse que no se produce durante la filtración ninguna pérdida de sustancia problema.

1.9.2. **Etapa 1: Estudio preliminar**

La finalidad de llevar a cabo un estudio preliminar figura ya en el punto 1.2 «Objeto». Con el experimento sugerido más adelante se dan orientaciones sobre la realización de tal prueba.

1.9.2.1. *Selección de las proporciones óptimas suelo/solución*

Se utilizan 2 tipos de suelo y 3 proporciones suelo/solución (6 experimentos). Un tipo de suelo tendrá alto contenido de carbono orgánico y bajo contenido de arcilla; el otro, bajo contenido de carbono orgánico y alto contenido de arcilla. Se sugieren las proporciones siguientes:

— 50 g de suelo y 50 $cm^3$ de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1:1),

▼B

— 10 g de suelo y 50 $cm^3$ de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1:5),

— 2 g de suelo y 50 $cm^3$ de solución acuosa de la sustancia problema (proporción 1:25).

La cantidad mínima de suelo con la cual puede llevarse a cabo el experimento depende de las instalaciones del laboratorio y de las características de los métodos analíticos utilizados. Sin embargo, se recomienda utilizar por lo menos 1 g, y preferiblemente 2 g, para obtener resultados fiables en la prueba.

Una muestra de control con solamente la sustancia problema en solución de $CaCl_2$0,01 M (sin suelo) se somete precisamente al mismo tratamiento que los sistemas de prueba, para comprobar la estabilidad de la sustancia problema en solución de $CaCl_2$ y su posible adsorción a las superficies de los recipientes del ensayo.

Una muestra en blanco por suelo con la misma cantidad de suelo y el volumen total de 50 $cm^3$ de solución de $CaCl_2$0,01 M (sin sustancia problema) se somete al mismo procedimiento de prueba, con el fin de servir de contraste durante el análisis para detectar sustancias de interferencia o suelos contaminados.

Todos los experimentos, incluidos los controles y los blancos, deben llevarse a cabo al menos por duplicado. El número total de muestras que deben prepararse para el estudio puede calcularse en función de la metodología seguida.

Los métodos para el estudio preliminar y el estudio principal son generalmente los mismos; se mencionan las excepciones en su caso.

Las muestras de suelo secadas al aire se equilibran agitándolas con un volumen mínimo de 45 $cm^3$ de $CaCl_2$0,01 M durante una noche (12 horas) antes del día del experimento. Después se añade cierto volumen de la solución madre de sustancia problema para ajustar el volumen final a 50 $cm^3$. Este volumen añadido de la solución madre: a) no debe exceder del 10 % del volumen final de 50 $cm^3$ de la fase acuosa para cambiar lo menos posible la naturaleza de la solución de preequilibrado, y b) debe suponer preferiblemente una concentración inicial de la sustancia problema en contacto con el suelo ($C_o$) por lo menos dos órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico; este umbral garantiza la posibilidad de llevar a cabo medidas exactas incluso en caso de adsorción fuerte (> 90 %) y de determinar más tarde las isotermas de adsorción. También se recomienda que, a ser posible, la concentración inicial de sustancia ($C_o$) no supere la mitad de su límite de solubilidad.

Se da más abajo un ejemplo de cómo calcular la concentración de la solución madre ($C_{st}$). Se supone un límite de detección de 0,01 μg $cm^{-3}$ y una adsorción del 90 %; así pues, la concentración inicial de la sustancia problema en contacto con el suelo debe ser preferiblemente 1 μg $cm^{-3}$ (dos órdenes de magnitud más alta que el límite de detección). Suponiendo que se añade el volumen recomendado máximo de la solución madre (es decir, 5 $cm^3$ a 45 $cm^3$ de solución de equilibrado de $CaCl_2$0,01 M (= el 10 % de la solución madre hasta un volumen total de 50 $cm^3$ de fase acuosa), la concentración de la solución madre debe ser 10 μg $cm^{-3}$, que es tres órdenes de magnitud más alta que el límite de detección del método analítico.

El pH de la fase acuosa debe medirse antes y después del contacto con el suelo, puesto que desempeña un papel importante en todo el proceso de adsorción, especialmente en caso de sustancias ionizables.

▼B

Se agita la mezcla hasta que se alcance el equilibrio de adsorción. El tiempo de equilibrado de los suelos es muy variable, dependiendo de la sustancia química y del suelo; generalmente es suficiente un período de 24 horas (77). En el estudio preliminar pueden recogerse muestras secuencialmente durante un período de 48 horas desde la mezcla (por ejemplo, a las 4, 8, 24, 48 horas). Sin embargo, los tiempos de análisis deben considerarse con flexibilidad para tener en cuenta el horario de trabajo del laboratorio.

Hay dos opciones para el análisis de la sustancia problema en la solución acuosa: a) el método paralelo, y b) el método en serie. Debe insistirse en que, aunque el método paralelo sea experimentalmente más pesado, el tratamiento matemático de los resultados es más simple (apéndice 5). Sin embargo, la elección de la metodología seguida corresponde al experimentador, que habrá de considerar las instalaciones y los recursos disponibles del laboratorio.

a) Método paralelo: se preparan tantas muestras con la misma proporción de suelo/solución como intervalos de tiempo a que se desee estudiar la cinética de adsorción. Después de la centrifugación y, en su caso, filtración, la fase acuosa del primer tubo se recupera lo más completamente posible y se analiza después de, por ejemplo, 4 horas, la del segundo tubo después de 8 horas, la del tercero después de 24, etc.

b) Método en serie: se prepara solamente una muestra por duplicado de cada proporción suelo/solución. A los intervalos de tiempo definidos se centrifuga la mezcla para separar las fases. Se determina inmediatamente la sustancia problema en una pequeña alícuota de la fase acuosa: el experimento continúa con la mezcla original. Si se aplica la filtración después de la centrifugación, el laboratorio debe tener instalaciones para realizar la filtración de pequeñas alícuotas acuosas. Se recomienda que el volumen total de las alícuotas tomadas no exceda del 1 % del volumen total de la solución, para no cambiar mucho la proporción suelo/solución ni disminuir la masa de soluto disponible para la adsorción durante la prueba.

La adsorción porcentual se calcula a cada tiempo $A_{t_i}$ en función de la concentración inicial nominal y de la concentración medida a ese tiempo de muestreo ($t_i$), corregido para tener en cuenta el valor del blanco. Se realizan las gráficas de $A_{t_i}$ frente al tiempo (figura 1 del apéndice 5) para estimar la llegada a la meseta de equilibrio ([1]). También se calcula el valor de $K_d$ en el equilibrio. Tomando como base este valor de $K_d$, a partir de la figura 1 se seleccionan proporciones adecuadas suelo/solución, de modo que la adsorción porcentual alcance más del 20 % y, preferiblemente, > 50 % (61). Todas las ecuaciones y principios de gráficas aplicables figuran en el punto 2, de «Datos e informes», y en el apéndice 5.

1.9.2.2. *Determinación del tiempo de equilibrado de adsorción y de la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio*

Como ya se ha mencionado, las gráficas de $A_{t_i}$ o $C_{aq}^{ads}$ frente al tiempo permiten la estimación del logro del equilibrio de adsorción y de la cantidad de sustancia problema adsorbida en el equilibrio. Las figuras 1 y 2 del apéndice 5 muestran ejemplos de tales gráficas. El tiempo de equilibrado es el que necesita el sistema para alcanzar una meseta.

([1]) También pueden utilizarse gráficas de la concentración de la sustancia problema en la fase acuosa $C_{aq}^{ads}$ frente al tiempo para estimar la llegada a la meseta de equilibrio (véase la figura 2 del apéndice 5).

▼B

Si, con un suelo determinado, no se llega a ninguna meseta sino que hay un aumento constante, puede deberse a la complicación por factores tales como la biodegradación o la difusión lenta. La biodegradación puede comprobarse repitiendo el experimento con una muestra esterilizada del suelo. Si no se logra ninguna meseta incluso en este caso, el experimentador debe realizar estudios específicos para buscar otros fenómenos que pudieran darse: puede hacerse con modificaciones apropiadas de las condiciones del experimento (temperatura, tiempos de agitación, proporciones suelo/solución). Corresponde al experimentador decidir si continúa con el procedimiento de prueba a pesar de que posiblemente no se llegue a lograr el equilibrio.

1.9.2.3. *Adsorción en la superficie del recipiente del ensayo y estabilidad de la sustancia problema*

Analizando las muestras de control puede obtenerse información sobre la adsorción de la sustancia problema en la superficie de los recipientes del ensayo, así como sobre su estabilidad. Si se observa una disminución superior al error típico del método analítico, puede haber fenómenos de degradación abiótica o adsorción en la superficie del recipiente del ensayo. Puede conseguirse distinguir entre estos dos fenómenos lavando a fondo las paredes del recipiente con un volumen conocido de un solvente apropiado y determinando la sustancia problema en la solución de lavado. Si no se observa ninguna adsorción en la superficie de los recipientes del ensayo, la disminución confirma la inestabilidad abiótica de la sustancia problema. Si se encuentra adsorción, es necesario cambiar el material de los recipientes del ensayo. Sin embargo, los datos sobre la adsorción en la superficie de los recipientes del ensayo obtenidos de este experimento no pueden extrapolarse directamente al experimento con suelo/solución. La presencia de suelo afecta a esta adsorción.

Puede obtenerse información adicional sobre la estabilidad de la sustancia problema mediante la determinación del balance de masa parental a lo largo del tiempo. Esto significa que se determina la sustancia problema en la fase acuosa, en los extractos de suelo y en las paredes del recipiente del ensayo. La diferencia entre la masa de la sustancia problema añadida y la suma de las masas de la sustancia problema en la fase acuosa, extractos de suelo y paredes de los recipientes del ensayo es igual a la masa degradada, volatilizada o no extraída. Para llevar a cabo una determinación del balance de masa, debe haberse alcanzado el equilibrio de adsorción en el tiempo que dure el experimento.

El balance de masa se lleva a cabo en ambos suelos y con una proporción suelo/solución por suelo que dé una disminución por encima del 20 % (preferiblemente > 50 %) en el equilibrio. Cuando se termine el experimento de selección de la proporción con el análisis de la última muestra de la fase acuosa después de 48 horas, las fases se separan por centrifugación y, si se desea, filtración. Se recupera lo más posible de la fase acuosa, y se añade al suelo un solvente de extracción conveniente (coeficiente de extracción de por lo menos el 95 %) para extraer la sustancia problema. Se recomienda hacer por lo menos dos extracciones sucesivas. Se determina la cantidad de sustancia problema presente en los extractos de recipientes del ensayo y del suelo, y se calcula el balance de masa (ecuación 10 en el punto 2.1.2). Si es inferior al 90 %, se considera que la sustancia problema es inestable en la escala de tiempo de la prueba. Sin embargo, los estudios podían aún continuar, teniendo en cuenta la inestabilidad de la sustancia problema; en este caso se recomienda analizar ambas fases en el estudio principal.

▼B

1.9.3. *Etapa 2: Cinética de adsorción con una concentración de la sustancia problema*

Se utilizan 5 suelos, seleccionados a partir del cuadro 1. Es conveniente la inclusión entre estos 5 suelos de algunos o de todos los suelos utilizados en el estudio preliminar, si procede. En tal caso, la etapa 2 no tiene que repetirse con los suelos utilizados en el estudio preliminar.

El tiempo de equilibrado, la proporción suelo/solución, el peso de la muestra de suelo, el volumen de la fase acuosa en contacto con el suelo y la concentración de la sustancia problema en la solución se seleccionan basándose en los resultados del estudio preliminar. Es mejor hacer el análisis aproximadamente después de un tiempo del contacto de 2, 4, 6, 8 (quizás también 10) y 24 horas; el tiempo de agitación puede ampliarse a un máximo de 48 horas en caso de que una sustancia requiera un tiempo más largo de equilibrado según los resultados de la selección de la proporción. Sin embargo, los tiempos de análisis pueden considerarse con flexibilidad.

Se hace cada experimento (un suelo y una solución) al menos por duplicado para poder estimar la varianza de los resultados. En cada experimento se lleva a cabo una prueba en blanco, con suelo y solución de $CaCl_2$0,01 M, sin sustancia problema, y con un peso y un volumen, respectivamente, idénticos a los del experimento. Se somete al mismo procedimiento de prueba una muestra de control con solamente la sustancia problema en solución de $CaCl_2$0,01 M (sin suelo) como precaución frente a fenómenos inesperados.

La adsorción porcentual se calcula a cada tiempo $A_{t_i}$ o intervalo de tiempo $A_{\Delta t_i}$ (según sea necesario) y se representa gráficamente frente al tiempo. También se calcula el coeficiente de distribución $K_d$ en el equilibrio, así como el coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico $K_{oc}$ (con sustancias orgánicas no polares).

Resultados de la prueba de cinética de adsorción

El valor lineal de $K_d$ es generalmente exacto para describir el comportamiento respecto a la sorción en el suelo (35) (78) y refleja la movilidad inherente de las sustancias químicas en el suelo. Por ejemplo, en general, las sustancias con $K_d < 1\ cm^3\ g^{-1}$ se consideran cualitativamente móviles. Del mismo modo, MacCall *et al.* (16) han elaborado un sistema de clasificación de la movilidad basado en valores de $K_{oc}$ (16). Además, hay sistemas de clasificación de la lixiviación basados en la relación entre $K_{oc}$ y DT-50 ([1]) (32) (79).

También, según estudios de análisis de error (61), los valores de $K_d$ inferiores a $0,3\ cm^3\ g^{-1}$ no pueden estimarse exactamente a partir de una disminución de la concentración en la fase acuosa, incluso cuando se aplica la proporción más favorable suelo/solución (desde el punto de vista de la exactitud), es decir, 1:1. En este caso se recomienda el análisis de ambas fases, suelo y solución.

([1]) DT-50: tiempo necesario para la degradación del 50 % de la sustancia problema.

▼B

En cuanto a las observaciones mencionadas, se recomienda que el estudio del comportamiento de la adsorción de una sustancia química en el suelo y de su movilidad potencial continúe mediante la determinación de las isotermas de adsorción de Freundlich para los sistemas de los cuales sea posible una determinación exacta de $K_d$ con el protocolo experimental seguido en este método de ensayo. La determinación exacta es posible si el valor que resulta de multiplicar $K_d$ por la proporción suelo/solución es >, cuando las medidas se basan en la disminución de la concentración de la fase acuosa (método indirecto), o bien >, cuando se analizan ambas fases (método directo) (61).

1.9.4. *Etapa 3: Isotermas de adsorción y cinética de desorción/isotermas de desorción*

1.9.4.1. Isotermas de adsorción

Se utilizan 5 concentraciones de sustancia problema que cubran preferiblemente dos órdenes de magnitud; en la selección de estas concentraciones deben tenerse en cuenta la hidrosolubilidad y las concentraciones acuosas resultantes en el equilibrio. Debe mantenerse la misma proporción suelo/solución por suelo a lo largo del estudio. La prueba de adsorción se lleva a cabo según lo descrito anteriormente, con la única diferencia de que la fase acuosa se analiza solamente una vez, al tiempo necesario para alcanzar el equilibrio según lo determinado antes en la etapa 2. Se determinan las concentraciones de equilibrio en la solución y se calcula la cantidad adsorbida a partir de la disminución de la sustancia problema en la solución o con el método directo. La masa adsorbida por unidad de masa del suelo se representa gráficamente en función de la concentración de la sustancia problema en el equilibrio (véase el punto 2, «Datos e informes»).

Resultados del experimento de isotermas de adsorción

Entre los modelos matemáticos de adsorción propuestos hasta ahora, el de las isotermas de Freundlich es el utilizado más frecuentemente para describir procesos de adsorción. En las referencias (41) (45) (80) (81) (82) se proporciona información más detallada sobre la interpretación e importancia de los modelos de adsorción.

Nota: Debe indicarse que es posible comparar los valores de $K_F$ (coeficiente de adsorción de Freundlich) de diferentes sustancias solamente si estos valores de $K_F$ se expresan en las mismas unidades (83).

1.9.4.2. Cinética de desorción

El propósito de este experimento es investigar si una sustancia química se adsorbe reversible o irreversiblemente a un suelo. Esta información es importante, puesto que el proceso de desorción también desempeña un papel destacado en el comportamiento de las sustancias en el suelo de campo. Por otra parte, los datos de desorción son útiles para la modelización por ordenador de la lixiviación y la simulación del arrastre de sustancias disueltas. Si se desea hacer un estudio de desorción, se recomienda que el estudio descrito a continuación se lleve a cabo con cada sistema para el cual haya sido posible una determinación exacta de $K_d$ en el experimento anterior de cinética de adsorción.

Análogamente al estudio de cinética de adsorción, hay dos opciones para proceder con el experimento de cinética de desorción: a) el método paralelo, y b) el método en serie. La selección de la metodología seguida corresponde al experimentador, que tendrá en cuenta las instalaciones y los recursos del laboratorio.

▼B

a) Método paralelo: de cada suelo seleccionado para realizar el estudio de desorción se preparan tantas muestras con la misma proporción suelo/solución como intervalos de tiempo a que se desee estudiar la cinética de desorción. Es preferible utilizar los mismos intervalos de tiempo que en el experimento de cinética de adsorción: sin embargo, el tiempo total puede ampliarse según sea necesario para que el sistema alcance el equilibrio de desorción. En cada experimento (un suelo, una solución) se lleva a cabo una prueba en blanco, con suelo y solución de $CaCl_2$ 0,01 M, sin la sustancia problema, y con un peso y un volumen, respectivamente, idénticos a los del experimento. Como muestra de control, la sustancia problema en solución de $CaCl_2$ 0,01 M (sin suelo) se somete al mismo procedimiento de prueba. Todas las mezclas del suelo con la solución se agitan basta que se alcance el equilibrio de adsorción (según lo determinado antes en la etapa 2). Entonces, las fases se separan por centrifugación y las fases acuosas se retiran en la mayor proporción posible. El volumen de solución retirado se sustituye con un volumen igual de $CaCl_2$ 0,01 M sin sustancia problema y las nuevas mezclas se agitan otra vez. La fase acuosa del primer tubo se recupera lo más completamente posible y se analiza después de, por ejemplo, 2 horas, la del segundo tubo después de 4 horas, la del tercero después de 6 horas, etc., hasta que se alcance el equilibrio de desorción.

b) Método en serie: después del experimento de cinética de adsorción, se centrifuga la mezcla y se retira lo más posible la fase acuosa. El volumen de solución retirado se sustituye con un volumen igual de $CaCl_2$ 0,01 M sin sustancia problema. La nueva mezcla se agita hasta que se alcance el equilibrio de desorción. Durante este período, a intervalos de tiempo definidos, se centrifuga la mezcla para separar las fases. En una pequeña alícuota de la fase acuosa se determina inmediatamente la sustancia problema; el experimento continúa después con la mezcla original. El volumen de cada alícuota debe ser menos del 1 % del volumen total. Se añade a la mezcla la misma cantidad de solución de $CaCl_2$ 0,01 M para mantener la proporción suelo/solución, y continúa la agitación hasta el intervalo siguiente.

La desorción porcentual se calcula a cada tiempo ($D_{t_i}$) o intervalo de tiempo ($D_{\Delta t_i}$) (según las necesidades del estudio) y se representa frente al tiempo. También se calcula el coeficiente de desorción $K_{des}$ en el equilibrio. Todas las ecuaciones aplicables figuran en el punto 2, «Datos e informes», y en el apéndice 5.

Resultados del experimento de cinética de desorción

Las gráficas comunes de la desorción $D_{t_i}$ y la adsorción $A_{t_i}$ porcentuales frente al tiempo permiten valorar la reversibilidad del proceso de adsorción. Si el equilibrio de desorción se logra incluso dentro del doble del tiempo de equilibrio de adsorción, y la desorción total es de más del 75 % de la cantidad adsorbida, se considera que la adsorción es reversible.

1.9.4.3. Isotermas de desorción

Las isotermas de desorción de Freundlich se determinan con los suelos utilizados en el experimento de las isotermas de adsorción. La prueba de desorción se lleva a cabo según lo descrito en el punto 1.9.2.5.2, «Cinética de desorción», con la única diferencia de que la fase acuosa se analiza solamente una vez, en el equilibrio de desorción. Se calcula la cantidad de sustancia problema desorbida. El contenido de sustancia problema que permanece adsorbida al suelo en el equilibrio de desorción se representa en función de la concentración de equilibrio de la sustancia problema en la solución (véase a continuación «Datos e informes» y el apéndice 5).

▼B

2. **DATOS E INFORMES**

Los datos analíticos se presentan en forma de cuadro (véase el apéndice 6). Se dan las medidas y las medias calculadas. Se proporcionan las representaciones gráficas de las isotermas de adsorción. Se hacen los cálculos según lo descrito más adelante.

Para la prueba, se considera que el peso de 1 $cm^3$ de solución acuosa es 1 g. La proporción suelo/solución puede expresarse en unidades de peso/peso o de peso/volumen con la misma cifra.

2.1. ADSORCIÓN

La adsorción $A_{t_i}$ se define como el porcentaje de sustancia adsorbida en el suelo en relación con la cantidad presente al principio de la prueba, en las condiciones de prueba. Si la sustancia problema es estable y no se adsorbe significativamente a la pared del recipiente, $A_{t_i}$ se calcula a cada tiempo $t_i$, según la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0}(\%) \qquad (3)$$

donde:

$A_{t_i}$ = adsorción porcentual al tiempo $t_i$ (%),

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo al tiempo $t_i$ (µg),

$m_0$ = masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al principio de la prueba (µg).

En el apéndice 5 figura información detallada sobre el cálculo de la adsorción porcentual $A_{t_i}$ con los métodos paralelo y en serie.

El coeficiente de distribución $K_d$ es la proporción entre el contenido de sustancia en la fase edáfica y la concentración en masa de la sustancia en la solución acuosa, en las condiciones de prueba, cuando se alcanza el equilibrio de adsorción:

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (4)$$

donde:

$C_s^{ads}(eq)$ = contenido de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción (µg $g^{-1}$),

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de adsorción (µg $cm^{-3}$); esta concentración se determina analíticamente teniendo en cuenta los valores obtenidos en las pruebas en blanco,

$m_s^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción (µg),

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción (µg),

$m_{soil}$ = cantidad de la fase edáfica, expresada en masa seca de suelo (g),

$V_o$ = volumen inicial de la fase acuosa en contacto con el suelo ($cm^3$).

La relación entre $A_{eq}$ y $K_d$ se da en la ecuación siguiente:

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}}(cm^3\ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

donde:

$A_{eq}$ = adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción (%).

El coeficiente de adsorción normalizado para tener en cuenta el carbono orgánico $K_{oc}$ relaciona el coeficiente de distribución $K_d$ con el contenido de carbono orgánico de la muestra de suelo:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC}(cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

donde:

% OC = porcentaje de carbono orgánico en la muestra de suelo ($g\ g^{-1}$).

El coeficiente $K_{oc}$ representa un solo valor que caracteriza el reparto principalmente de las sustancias orgánicas no polares entre el carbono orgánico del suelo o sedimento y el agua. La adsorción de estas sustancias está correlacionada con el contenido orgánico del sólido de sorción (7): así pues, los valores de $K_{oc}$ dependen de las características específicas de las fracciones húmicas que difieren considerablemente en su capacidad de sorción, debido a diferencias de origen, génesis, etc.

2.1.1. **Isotermas de adsorción**

La ecuación de las isotermas de adsorción de Freundlich relaciona la cantidad de sustancia problema adsorbida con la concentración de sustancia problema en la solución en el equilibrio (ecuación 8).

Los datos se tratan como en el punto 2.1, «Adsorción», y, de cada tubo de ensayo, se calcula el contenido de sustancia problema adsorbida en el suelo después de la prueba de adsorción [$C_s^{ads}(eq)$, en otras partes expresado como x/m]. Se acepta que se ha logrado el equilibrio y que $C_s^{ads}(eq)$ representa el valor de equilibrio:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)].V_0}{m_{soil}}(\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

La ecuación de adsorción de Freundlich es la siguiente (8):

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads}.C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n}\ (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

o, en forma lineal:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

donde:

$K_F^{ads}$ = coeficiente de adsorción de Freundlich: su dimensión es $cm^3\ g^{-1}$ solo si l/n = 1; en los demás casos, se introduce la pendiente 1/n en la dimensión ce $K_F^{ads}$ ($\mu g^{1-l/n}\ (cm^3)^{l/n}\ g^{-1}$)

n = constante de regresión: l/n generalmente oscila entre 0,7 y 1,0, indicando que los datos de sorción suelen ser ligeramente no lineales.

Se representan gráficamente las ecuaciones (8) y (9) y se calculan los valores de $K_F^{ads}$ y 1/n por análisis de regresión utilizando la ecuación 9. También se calcula el coeficiente de correlación $r^2$ de la ecuación logarítmica. En la figura 2 se da un ejemplo de tales representaciones:

▼B

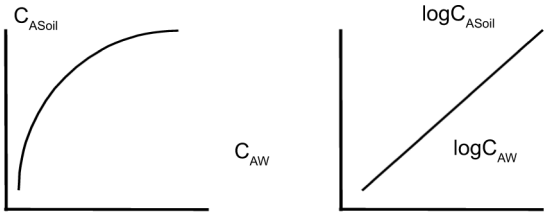



**Figura 2.** Representación de la adsorción de Freundlich, normal y linealizada

2.1.2. **Balance de masa**

El balance de masa (MB) se define como el porcentaje de sustancia que puede recuperarse analíticamente después de una prueba de adsorción respecto a la cantidad nominal de sustancia presente al principio de la prueba.

El tratamiento de los datos será diferente si el solvente es completamente miscible con agua. En caso de un solvente miscible con agua, el tratamiento de los datos descrito en el punto 2.2, «Desorción» puede aplicarse para determinar la cantidad de sustancia recuperada por la extracción con el solvente. Si el solvente es menos miscible con agua, hay que hacer la determinación de la cantidad recuperada.

El balance de masa MB de la adsorción se calcula del siguiente modo; se supone que el término $m_E$ corresponde a la suma de las masas de la sustancia problema extraídas del suelo y de la superficie del recipiente del ensayo con un solvente orgánico:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0}(\%) \qquad (10)$$

donde:

MB = balance de masa (%)

$m_E$ = masa total de la sustancia problema extraída del suelo y de las paredes del recipiente del ensayo en dos fases (μg),

$C_o$ = concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo (μg $cm^{-3}$),

$V_{rec}$ = volumen de sobrenadante recuperado después del equilibrio de adsorción ($cm^{-3}$).

2.2. DESORCIÓN

La desorción (D) se define como el porcentaje de sustancia problema que se desorbe, en relación con la cantidad de sustancia adsorbida previamente, en las condiciones de prueba:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_S^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

donde:

$D_{ti}$ = desorción porcentual a un tiempo $t_i$ (%),

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = masa de la sustancia problema desorbida del suelo a un tiempo $t_i$ (μg),

$m_s^{ads}(eq)$ = masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción (μg).

En el apéndice 5 figura información detallada sobre cómo calcular la desorción porcentual $D_{t^i}$ con los métodos paralelo y en serie.

El coeficiente de desorción aparente ($K_{des}$) es, en las condiciones de prueba, la proporción entre el contenido de sustancia que permanece en la fase edáfica y la concentración en masa de la sustancia desorbida en la solución acuosa, cuando se alcanza el equilibrio de desorción:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

donde:

$K_{des}$ = coeficiente de desorción ($cm^3\ g^{-1}$),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masa total de la sustancia problema desorbida del suelo en el equilibrio de desorción (μg),

$V_T$ = volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante la prueba de cinética de desorción ($cm^3$).

En el apéndice 5, en la sección «Desorción», figuran directrices para calculan $m_{aq}^{des}(eq)$

Observación

Si la prueba de adsorción precedente se ha llevado a cabo con el método paralelo, se considera que el volumen $V_T$ de la ecuación 12 es igual a $V_o$.

2.2.1. **Isotermas de desorción**

La ecuación de isotermas de desorción de Freundlich relaciona el contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo con la concentración de la sustancia problema en la solución en el equilibrio de desorción (ecuación 16).

Para cada tubo de prueba, el contenido de sustancia que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción se calcula del modo siguiente:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ se define como:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A(\mu g) \quad (14)$$

donde:

$C_s^{des}(eq)$ = contenido de la sustancia problema que permanece adsorbida en el suelo en el equilibrio de desorción (μg $g^{-1}$),

$m_m^{des}(eq)$ = masa de la sustancia determinada analíticamente en la fase acuosa en el equilibrio de desorción (μg),

▼B

$m_{aq}^{A}$ = masa de la sustancia problema que queda en solución después de alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen (μg),

$m_{aq}^{des}(eq)$ = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

$V_r^F$ = volumen de solución tomada del tubo para la medida de la sustancia problema, en el equilibrio de desorción ($cm^3$),

$V_R$ = volumen del sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de $CaCl_2$0,01 M ($cm^3$).

A continuación se muestra la ecuación de desorción de Freundlich:

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (16)$$

o, en forma lineal:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

donde:

$K_F^{des}$ = coeficiente de desorción de Freundlich,

n = constante de regresión,

$C_{aq}^{des}(eq)$ = concentración en masa en la sustancia en la fase acuosa en el equilibrio de desorción (μg $cm^{-3}$).

Las ecuaciones 16 y 17 pueden representarse gráficamente y el valor de $K_F^{des}$ y el de 1/n se calculan por análisis de regresión utilizando la ecuación 17.

Observación

Si el exponente l/n de adsorción o desorción de Freundlich es igual a 1, la constante de enlace de adsorción o desorción de Freundlich ($K_F^{ads}$ y $K_F^{des}$) será respectivamente igual a la constante de equilibrio de adsorción o desorción ($K_d$ y $K_{des}$), y las gráficas de $C_s$ frente a $C_{aq}$ serán lineales. Si los exponentes no son iguales a 1, las gráficas de $C_s$ frente a $C_{aq}$ no serán lineales y las constantes de adsorción y desorción variarán a lo largo de las isotermas.

2.2.2. **Informe de la prueba**

El informe de la prueba debe incluir la información siguiente:

— identificación completa de las muestras de suelo utilizadas, incluyendo:

— referencia geográfica del sitio (latitud, longitud),

— fecha del muestreo,

▼B

— tipo de uso (por ejemplo, suelo agrícola, bosque, etc.),

— profundidad del muestreo,

— contenido de arena/limo/arcilla,

— valores de pH (en $CaCl_2$ 0,01 M),

— contenido de carbono orgánico,

— contenido de materia orgánica,

— contenido de nitrógeno,

— proporción C/N,

— capacidad de intercambio canónico (mmol/kg),

— toda la información relativa a la recogida y conservación de las muestras de suelo,

— en su caso, toda información pertinente para la interpretación de la adsorción/desorción de la sustancia problema,

— referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro;

— información sobre la sustancia problema según el caso;

— temperatura de los experimentos;

— condiciones de centrifugación;

— procedimiento analítico utilizado para analizar la sustancia problema;

— justificación del uso eventual de agentes de solubilización para la preparación de la solución madre de la sustancia problema;

— explicación de las correcciones hechas en los cálculos, en su caso;

— datos según las fichas (apéndice 6) y representaciones gráficas;

— toda la información y observaciones útiles para la interpretación de los resultados de la prueba.

3. **REFERENCIAS**

(1) Kukowski H. and Brummer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L, (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication no. 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995 (June 1995).

(5) US-Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N., Chemistry; Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting. 540/09-SS-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US-Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances. OPPTS Harmonized Test Guidelines. Series 835-Fate, Transpon and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 71 2-C-96-048. April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant ($K_{oc}$) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), 'Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticidas in soils', in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, París, (Review).

(13) Calvet R., (1980) 'Adsorption-Desorption Phenomena' in Interactions between herbicides and the soil. (R.J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83-122.

(14) Hasset J.J., and Banwart W.L. (1989), The sorption of nonpolar organics by soils and sediments' in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp 31-44.

(15) van Genuchten M. Th., Davidson J.M., and Wierenga P.J., (1974), 'An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media'. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), 29-35.

(16) McCall P.J., Laskowski D.A. Swann R.I., and Dishburger H.J., (1981), 'Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis', in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S.M., Porter P.E., and Schieferrstein R.H., (1965), 'Movement and sorption of chemicals applied to the soil'. Weeds, 13, 185-190.

(18) Rhodes R.C., Belasco I.J., and Pease H.L., (1970) 'Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils'. J.Agric.Food Chem., 18, 524-528.

(19) Russell M.H., (1995), 'Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil' in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T.R. Roberts and P.C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H.O., Hemingway R.J., Klein W., Sharp D.R., Vonk J.W. and Holland P.T., (1988), 'Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides', IUPAC Reports on Pesticidas (24). Pure Appl. Chem., 60, 901-932.

▼B

(21) Guth J.A., Burkhard N., and D.O. Eberle, (1976), 'Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils'. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp 137-157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C.G.L., and Osgerby J.M., (1967), 'Persistence of herbicides in soil'. J. Sci. Fd Agric, 18, 269-273.

(23) Burkhard N., and Guth J.A., (1981). 'Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(aikylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption'. Pestic. Sci. 12, 45-52.

(24) Guth J.A., Gerber H.R., and Schlaepfer T., (1977). 'Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides'. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, 961-971.

(25) Osgerby J.M., (1973), 'Process affecting herbicide action in soil'. Pestic. Sci., 4, 247-258.

(26) Guth J.A., (1972), 'Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden'. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlm-Dahlem, Heft 37, 143-154.

(27) Hamaker J.W., 1975), The interpretation of soil leaching experiments', in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Flaque and V.H. freed). pp. 1 3 5-172, Plenum Press, NY.

(28) Helling C.S., (1971). 'Pesticide mobility in soils'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35, 732-210.

(29) Hamaker J.W., (1972), 'Diffusion and volatilization' in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J.W. Hamaker eds), Vol. I, 49-143.

(30) Burkhard N. and Guth J.A., (1981), 'Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system'. Pestic. Sci. 12, 37-44.

(31) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), 'Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D.I., (1989), 'Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability'. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4). 339-357.

(33) Leistra M., and Dekkers W.A., (1976). 'Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils'. J. of Soil Sci., 28, 340-350.

(34) Bromilov R.H., and Leistra M. (1980), 'Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation producís in fallow soils'. Pest. Sci., 11, 389-395.

(35) Green R.E., and Karickoff S.W., (1990), 'Sorption estimates for modeling', in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80-101.

(36) Lambert S.M., (1967), 'Functional relationship between sorption in soil and chemical structure'. J. Agri. Food Chem., 15, 572-576.

▼B

(37) Hance R.J., (1969), 'An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils'. J. Agri. Food Chem., 17, 667-668.

(38) Briggs G.G. (1969), 'Molecular structure of herbicides and their sorption by soils'. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G.G. (1981). 'Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor'. J. Agric. Food Chem., 29, 1050-1059.

(40) Sabljic A., (1984), 'Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology'. J. Agrie. Food Chem., 32, 243-246.

(41) Bailey G.W., and White J.L., (1970), 'Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil'. Residue Rev., 32, 29-92.

(42) Bailey G.W., J.L. White and Y. Rothberg. (1968), 'Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate'. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32:222-234.

(43) Karickhoff S.W., (1981) 'Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils'. Chemosphere 10, 83 3-846.

(44) Paya-Pérez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), 'Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners'. Environ. Toxicol. Safety 21, 1-17.

(45) Hamaker J.W., and Thompson J.M, (1972). 'Adsorption in organic cbemicals' in Organic Chemicals ir. the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York. NY, 1972, pp. 49-143.

(46) Deli J., and Warren G.F., 1971, 'Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils'. Weed Sci. 19:67-69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J.M, and Santelmann, (1975), 'Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils'. Weed Science, Vol. 23, 454-457.

(48) Haues M.H.B., Stacey M., and Thompson J.M., (1968) 'Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations' in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p. 75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H.B., and Deangelis R.J. (1980), 'Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase', CREAMS. in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosión from Agricultural Management Systems, Chapter 19. Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality — General aspeets; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F. and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F., Enke Verlag. Stuttgart (1982), 11 th edition.

(52) Black, Evans D.D., White J.L., Ensminger L.E., and Clark F.E., eds. «Methods of Soil Analysis», Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality — Sampling — Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality — Sampling — Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality — Sampling — Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality — Sampling — Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality — Sampling — Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R.E., and Yamane V.K., (1970) «Precision in pesticide adsorption measurements». Soil Sci. Am. Proc, 34, 353-354.

(60) Grover R., and Hance R.J. (1970), «Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine». Soil Sci., 109-138.

(61) Boesten, J.J.T.I, 'Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system'. Pest. Sci. 1990, 30, 31-41.

(62) Boesten, J.J.T.I. «Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106» Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Bmssels, 26-29 April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J.M., et Coste C, (1980), «Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique». Weed Res. 21, 227-231.

(64) Brown D.S., and Flagg E.W., (1981), «Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments»). Environ.Qual., 10(3), 382-386.

(65) Chiou C.T., Porter P.E., and Schmedding D.W., (1983), «Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water». Environ. Sci. Technol., 17(4), 227-231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), 'Sorption of organic substances by soils and sediments'. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), 297-312.

(67) Vowles P.D., and Mantoura R.F.C., (1987), 'Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons'. Chemosphere, 16(1), 109-116.

(68) Lyman W.J., Reehl W.F.and Rosenblatt D.H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E.E., and Goring, C.A.I. (1980). «Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota» in Aquatic Toxicology (eds J.G. Eaton, et al.), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C.T., Peters L.J., and Freed V.H., (1979), «A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds». Science, Vol. 206, 831-832.

(71) Hassett J.J., Banwart W.I., Wood S.G., and Means J.C., (1981). 'Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption'. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, 38-42.

(72) Karickhoff S.W., (1981), «Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils». Chemosphere, Vol. 10(8), 8 3 3-846.

(73) Moreale A., van Bladel R.. (1981), 'Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité — reactivité. Revue de l'Agric. 34 (4), 319-322'.

(74) Müller M., Kördel W. (1996), «Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil». Chemosphere. 32(12), 2493-2504.

(75) Kördel \V., Kotthoff G.. Müller M. (1995), 'HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — results of a ring test'. Chemosphere 30 (7), 1373-1 3S4.

(76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), 'HPLC — screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil — comparison of different stationary phases'. Chemosphere 27 (12), pp. 2341-2352.

(77) Hance, R.J., (1967), 'The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides'. Weed Research, Vol. 7, pp. 29-36.

(78) Koskinen W.C., and Harper S S., (1990), 'The retention processes: mechanisms' in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S.Z., Creeger S.M., Carsel R.F., and Enfield C.G. (1984), 'Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses', in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C.H., (1970), 'Interpretation and use of sorption isotherms' in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14-32.

(81) Giles, C.H.; McEwan J.H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), 'Studies in adsorption: XI, A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils'. J. Chem. Soc, pp. 3973-93.

(82) Calvet R., Tercé M, and Arvien J.C., (1980), 'Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générales de l'adsorption'. Ann. Agron. 31: pp. 239-251.

(83) Bedbur E., (1996), 'Anomalies in the Freundlich equation', Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

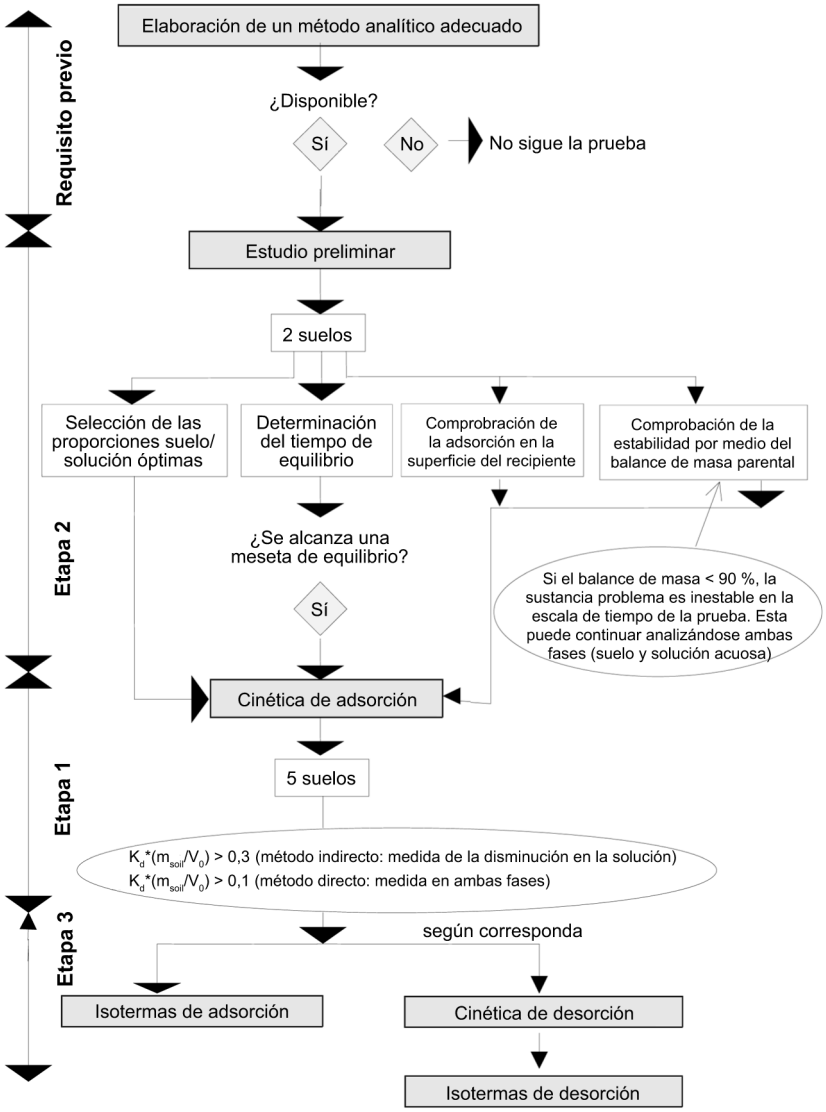
(84) Guth, J.A., (1985), 'Adsorption/desorption', in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1-3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 3 3, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

*Apéndice 1*

**Esquema de la prueba**



▼B

*Apéndice 2*

**INFLUENCIA DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO Y DEL CAMBIO DE CONCENTRACIÓN SOBRE LA EXACTITUD DE LOS RESULTADOS DE LA ADSORCIÓN**

A partir del cuadro siguiente (84), se ve que, cuando la diferencia entre la masa inicial ($m_0$ = 110 µg) y la masa en el equilibrio [$m_{aq}^{ads}$(eq) = 100 µg] de la sustancia problema en la solución es muy pequeña, un error del 5 % en la medida de la concentración en el equilibrio origina un error del 50 % en el cálculo de la masa de la sustancia adsorbida en el suelo [$m_s^{ads}$(eq)] y del 52,4 % en el cálculo de $K_d$.

Cantidad de suelo $m_{soil}$ = 10 g

Volumen de solución $V_o$ = 100 $cm^3$

| | $m_{aq}^{ads}$ (eq) (µg) | $C_{aq}^{ads}$ (eq) (µg $cm^{-3}$) | R | $m_s^{ads}$ (eq)* (µg) | $C_s^{ads}$ (eq)* (µg $g^{-1}$) | $R^t$ | $K_d$* | $R^t$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **PARA A = 9 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg o $C_o$ = 1,100 µg/$cm^3$ | 100 | 1,000 | Valor verd. | 10 | 1,00 | Valor verd. | 1 | |
| | 101 | 1,010 | 1 % | 9 | 0,90 | 10 % | 0,891 | 10,9 % |
| | 105 | 1,050 | 5 % | 5 | 0,50 | 50 % | 0,476 | 52,4 % |
| | 109 | 1,090 | 9 % | 1 | 0,10 | 90 % | 0,092 | 90,8 % |
| | **PARA A = 55 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg o $C_o$ = 1,100 µg/$cm^3$ | 50,0 | 0,500 | Valor verd. | 60,0 | 6,00 | Valor verd. | 12,00 | |
| | 50,5 | 0,505 | 1 % | 59,5 | 5,95 | 0,8 % | 11,78 | 1,8 % |
| | 52,5 | 0,525 | 5 % | 57,5 | 5,75 | 4,0 % | 10,95 | 8,8 % |
| | 55,0 | 0,550 | 10 % | 55,0 | 5,50 | 8,3 % | 10,00 | 16,7 % |
| | **PARA A = 99 %** | | | | | | | |
| $m_0$ = 110 µg o $C_n$ = 1,100 µg/$cm^3$ | 1,100 | 0,011 | Valor verd. | 108,9 | 10,89 | Valor verd. | 990 | |
| | 1,111 | 0,01111 | 1 % | 108,889 | 10,8889 | 0,01 % | 980 | 1,0 % |
| | 1,155 | 0,01155 | 5 % | 108,845 | 10,8845 | 0,05 % | 942 | 4,8 % |
| | 1,21 | 0,0121 | 10 % | 108,790 | 10,8790 | 0,10 % | 899 | 9,2 % |

donde:

$*m_s^{ads}$ (eq) = $m_0 - m_{aq}^{ads}(eq)$, $C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right]V_0}{m_{soil}}$. $Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$

$m_s^{ads}$ (eq) = masa de la sustancia problema en la fase edáfica en el equilibrio (µg),

$m_{aq}^{ads}$ (eq) = masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio (µg),

$C_s^{ads}$ (eq) = contenido de la sustancia problema en la fase edáfica en el equilibrio (µg $g^{-1}$),

$C_{aq}^{ads}$ (eq) = concentración en masa de la sustancia problema en la fase acuosa en el equilibrio (µg $cm^{-3}$),

R = error analítico en la determinación de $m_{aq}^{ads}$(eq),

R: = error calculado debido al error analítico R.

▼B

*Apéndice 3*

## TÉCNICAS DE ESTIMACIÓN DE $K_d$

1. Las técnicas de estimación permiten dar un valor de $K_d$ a partir de correlaciones observadas con, por ejemplo, valores de $P_{OW}$ (12) (39) (63) (64) (65) (66) (67) (68), datos de hidrosolubilidad (12) (19) (21) (39) (68) (69) (70) (71) (72) (73), o datos de polaridad obtenidos por aplicación de HPLC en fase inversa (74) (75) (76). Como se muestra en los cuadros 1 y 2, a partir de estas ecuaciones se calcula $K_{oc}$ o $K_{om}$ y después, indirectamente, se obtiene $K_d$ con las ecuaciones:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%\ oc}\ (cm^3 g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1{,}724} \cdot \frac{100}{\%\ oc}\ (cm^3 g^{-1})$$

2. Estas correlaciones se basan en dos suposiciones: 1) la materia orgánica del suelo es el factor que más influye en la adsorción de una sustancia, y 2) las interacciones implicadas son principalmente no polares. En consecuencia, estas correlaciones: 1) no son aplicables a las sustancias polares (o solo lo son de forma limitada), y 2) no son aplicables a los casos en que el contenido de materia orgánica del suelo es muy pequeño (12). Por otra parte, aunque se han encontrado correlaciones satisfactorias entre $P_{ow}$ y adsorción (19), no puede decirse lo mismo de la relación entre hidrosolubilidad y grado de adsorción (19) (21): en este sentido, los estudios son muy contradictorios.

3. En los cuadros 1 y 2 se dan ejemplos de correlaciones del coeficiente de adsorción con el coeficiente de reparto octanol-agua y con la hidrosolubilidad, respectivamente.

*Cuadro 1*

**Ejemplos de correlaciones entre el coeficiente de distribución de la adsorción y el coeficiente de reparto octanol-agua; pueden verse más ejemplos en (12) (68)**

| Sustancias | Correlaciones | Autores |
|---|---|---|
| Ureas sustituidas | $\log K_{om} = 0{,}69 + 0{,}52 \log P_{ow}$ | Briggs (1981) (39) |
| Aromáticas cloradas | $\log K_{oc} - 0{,}779 + 0{,}904 \log P_{ow}$ | Chiou *et al*. (1983) (65) |
| Diversos plaguicidas | $\log K_{om} = 4{,}4 + 0{,}72 \log P_{ow}$ | Gerstl y Mingelgrin (1984) (66) |
| Hidrocarburos aromáticos | $\log K_{oc} = - 2{,}53 + 1{,}15 \log P_{ow}$ | Vowles y Mantoura (1987) (67) |

*Cuadro 2*

**Ejemplos de correlaciones entre el coeficiente de distribución de la adsorción y la hidrosolubilidad; pueden verse más ejemplos en (68) (69)**

| Sustancias | Correlaciones | Autores |
|---|---|---|
| Diversos plaguicidas | $\log K_{om} = 3{,}8 - 0{,}561 \log S_w$ | Gerstl y Mingelgrin (1984) (66) |
| Sustancias cloradas aromáticas, alifáticas | $\log K_{om} = (4{,}040 +/- 0{,}038) - (0{,}557 +/- 0{,}012) \log S_w$ | Chiou *et al*. (1979) (70) |
| a-naftol | $\log K_{oc} = 4{,}273 - 0{,}686 \log S_w$ | Hasset et al. (1981) (71) |
| Sustancias aromáticas alifáticas, cíclicas | $\log K_{oc} = - 1{,}405 - 0{,}921 \log S_w - 0{,}00953$ (mp-25) | Karickhoff (1981) (72) |
| Diversos compuestos | $\log K_{om} = 2{,}75 - 0{,}45 \log S_w$ | Moreale van Blade (1982) (73) |

▼B

*Apéndice 4*

**CÁLCULOS PARA DEFINIR LAS CONDICIONES DE LA CENTRIFUGACIÓN**

1. El tiempo de centrifugación viene dado por la siguiente fórmula, suponiendo partículas esféricas:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Con fines de simplificación, todos los parámetros se dan en unidades ajenas al SI (g, cm),

donde:

(i) = velocidad de giro (=2 Π rpm/60) (rad $s^{-1}$),

rpm = revoluciones por minuto,

$\eta$ = viscosidad de la solución (g $s^{-1}$ $cm^{-1}$),

$r_p$ = radio de las partículas (cm),

$p_s$ = densidad del suelo (g $cm^{-3}$),

$\rho_{aq}$ = densidad de la solución (g $cm^{-3}$),

$R_t$ = distancia desde el centro del rotor de centrifugación hasta el nivel de la solución en el tubo de centrífuga (cm),

$R_b$ = distancia desde el centro del rotor de centrifugación hasta el fondo del tubo de centrífuga (cm),

$R_b$-$R_t$ = longitud de la mezcla suelo/solución en el tubo de centrífuga (cm).

En la práctica general, se utiliza un tiempo doble del calculado para conseguir una separación completa.

2. La ecuación (1) puede simplificarse más si consideramos que la viscosidad ($\eta$) y la densidad ($\rho_{aq}$) de la solución son iguales a la viscosidad y la densidad del agua a 25 °C: por tanto, $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g $s^{-1}$ $cm^{-1}$ and $\rho_{aq}$ = 1,0 g, $cm^{-3}$.

Entonces, el tiempo de centrifugación se obtiene con la ecuación 2):

$$t = \frac{3{,}7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. En la ecuación 2 se ve que hay dos parámetros importantes para definir las condiciones de la centrifugación, es decir, el tiempo (t) y la velocidad (rpm) necesarios para conseguir la separación de las partículas de un tamaño determinado (en nuestro caso, de 0,1 μm de radio): 1) la densidad del suelo, y 2) la altura de la mezcla en el tubo de centrífuga ($R_b$-$R_t$), es decir, la distancia que recorre una partícula de suelo desde el nivel superior de la solución hasta el fondo del tubo: evidentemente, con un volumen determinado, la altura de la mezcla en el tubo dependerá del cuadrado del radio del tubo.

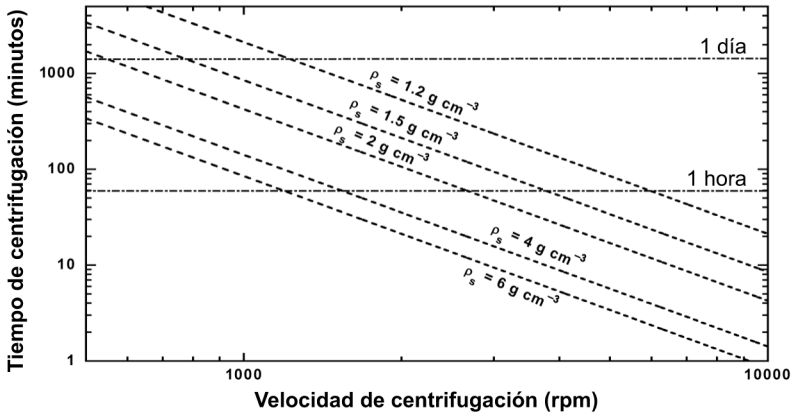
4. La figura 1 presenta las variaciones del tiempo de centrifugación (1) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes densidades de suelo ($\rho_s$) (figura 1a) y diferentes alturas de la mezcla en los tubos de centrífuga (figura 2a). En la figgura 1a queda de manifiesto la influencia de la densidad del suelo: por ejemplo, con una centrifugación clásica de 3 000 rpm el tiempo de centrifugación es de aproximadamente 240 minutos para una densidad de suelo de 1,2 g $cm^{-3}$, mientras que es de solo 50 minutos para 2,0 g $cm^{-3}$. Análogamente, según la figura 1b, con una centrifugación clásica de 3 000 rpm el tiempo de centrifugación es de aproximadamente 50 minutos para una altura de la mezcla de 10 cm y de solo 7 minutos para una altura de 1 cm. No obstante, es importante encontrar la relación óptima entre la centrifugación que requiera la menor altura posible y una manipulación fácil para el experimentador al separar las fases tras la centrifugación.

▼B

5. Por otra parte, al definir las condiciones experimentales para la separación de las fases suelo/solución, es importante considerar la posible existencia de una tercera «pseudofase», los coloides. Estas partículas, de tamaño inferior a 0,2 μm, pueden afectar considerablemente a todo el mecanismo de la adsorción de una sustancia en una suspensión de suelo. Cuando se realiza la centrifugación según se describe anteriormente, los coloides se quedan en la fase acuosa y se someten a análisis junto con la fase acuosa, con lo que se pierde la información sobre su influencia.

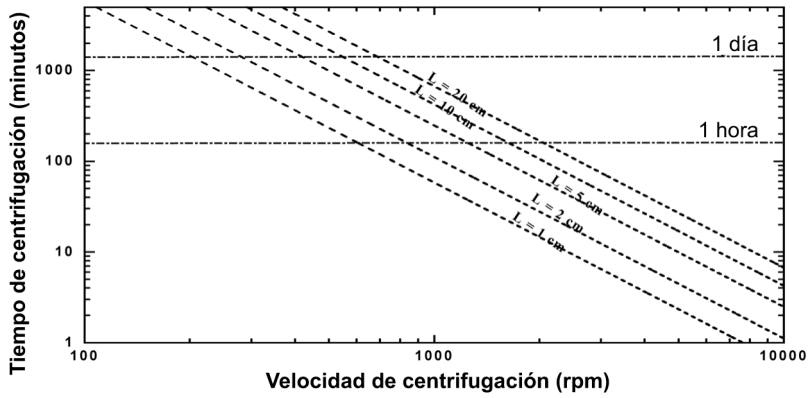
   Si el laboratorio donde se realiza la prueba tiene equipos de ultracentrifugación o ultrafiltración, es posible estudiar con mayor profundidad la adsorción/desorción de una sustancia en el suelo, con información sobre la adsorción de la sustancia en los coloides. En este caso, para separar las 3 fases (suelo, coloides, solución) debe realizarse una ultracentrifugación a 60 000 rpm/minuto o una ultrafiltración con una porosidad de 100 000 Dalton. También hay que modificar en consonancia el protocolo del ensayo, a fin de determinar la sustancia en las 3 fases.

**Figura 1a.**




Variaciones del tiempo de centrifugación (t) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes densidades de suelo ($\rho_s$). $R_t$ = 10 cm; $R_b$-$R_t$ = 10 cm; $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s$^{-1}$ cm$^{-1}$ and $\rho_{aq}$ = 1,0 g cm$^{-3}$ at 25 °C

**Figura 1b.**



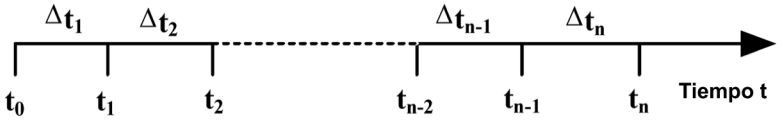

Variaciones del tiempo de centrifugación (t) frente a la velocidad de centrifugación (rpm) con diferentes alturas de la mezcla en el tubo de centrífuga ($R_D$-$R_t$) = L; $R_t$ = 10 cm; $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g s$^{-1}$ cm$^{-1}$; $\rho_{aq}$ = 1,0 g cm$^{-3}$ a 25 °C y $\rho_5$ = 2,0 g cm$^{-3}$.

▼B

*Apéndice 5*

**CÁLCULO DE LA ADSORCIÓN A (%) Y DE LA DESORCIÓN D (%)**

El esquema temporal del procedimiento es el siguiente:




A efectos de los cálculos, se supone que la sustancia problema es estable y no se adsorbe de forma importante a las paredes del recipiente.

ADSORCIÓN A (A%)

a) *Método paralelo*

La adsorción porcentual se calcula con cada tubo de ensayo (i) a cada tiempo ($t_i$), según la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Los términos de esta ecuación pueden calcularse de la forma siguiente:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

donde:

$A_{ti}$ = adsorción porcentual (%) al tiempo $t_i$,

$m_s^{ads}(t_i)$ = masa de la sustancia problema en el suelo al tiempo $t_i$ en que se realiza el análisis (μg),

$m_0$ = masa de la sustancia problema en el tubo de ensayo, al inicio de la prueba (μg),

$C_0$ = concentración inicial en masa de la solución problema en contacto con el suelo (μg $cm^{-3}$),

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = concentración en masa de la sustancia en la fase acuosa al tiempo $t_i$ en que se realiza el análisis (µg $cm^{-3}$); esta concentración se determina analíticamente teniendo en cuenta los valores obtenidos en la prueba en blanco,

$V_0$ = volumen inicial de la solución problema en contacto con el suelo ($cm^3$).

Los valores de la adsorción porcentual $A_{t_i}$ o $C_{aq}^{ads}(t_i)$ se representan gráficamente frente al tiempo y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de sorción. En las figuras 1 y 2 se recogen ejemplos de tales gráficas.

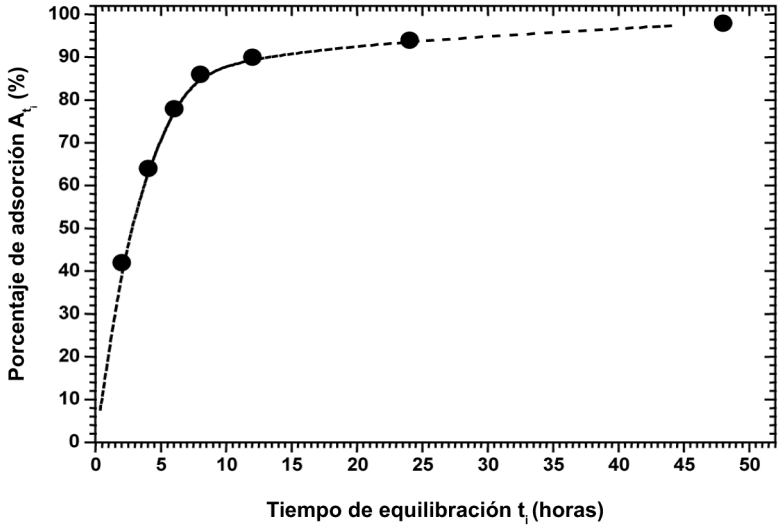



**Figura 1.**

Gráfica de equilibrio de adsorción

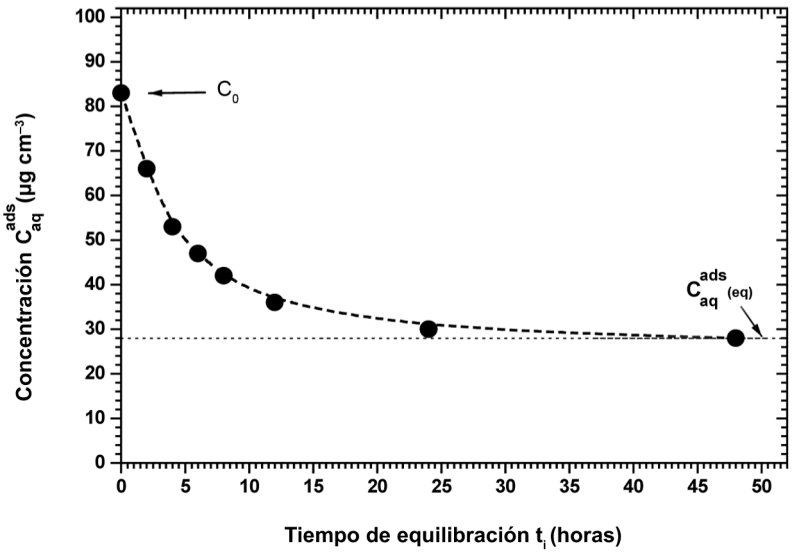



**Figura. 2.**

Concentración en masa dela sustancia problema en la dase acuosa ($C_{aq}$) frente al tiempo

▼B

b) *Método en serie*

Las siguientes ecuaciones tienen en cuenta que el procedimiento de adsorción se sigue con mediciones de la sustancia problema en pequeñas alícuotas de la fase acuosa a intervalos de tiempo especificados.

— Durante cada intervalo de tiempo, la cantidad de sustancia adsorbida en el suelo se calcula de la manera siguiente:

— para el primer intervalo de tiempo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) \quad (4)$$

— para el segundo intervalo de tiempo $\Delta t2 = t2 - t1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (5)$$

— para el tercer intervalo de tiempo $\Delta t3 = t3-t2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) \quad (6)$$

— para el enésimo intervalo de tiempo $\Delta tn = tn - tn\text{-}1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A}\right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{(V_0 - (n-1) \cdot v_a)^A}{v_a^A}\right) \quad (7)$$

— El porcentaje de adsorción a cada intervalo de tiempo; $A_{\Delta t_i}$, se calcula con la ecuación siguiente:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (8)$$

mientras que el porcentaje de adsorción $A_{t_i}$ al tiempo $t_i$ viene dado por la ecuación:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Los valores de la adsorción $A_{t_i}$ o $A_{\Delta t_i}$ (según las necesidades del estudio) se representan gráficamente frente al tiempo y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de sorción.

— Al tiempo de equilibrado $t_{eq}$:

— la masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo es:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— la masa de la sustancia problema en la solución es:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— y la adsorción porcentual en el equilibrio es:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (12)$$

Los parámetros usados en estas ecuaciones se definen de la forma siguiente:

$m_s^{ads}$ ($\Delta t_1$), $m_s^{ads}$ ($\Delta t_2$), ..., $m_s^{ads}$ ($\Delta t_n$) = masa de la sustancia adsorbida en el suelo durante los intervalos de tiempo $\Delta_{t1}$, $\Delta_{t2}$,..., $\Delta_{tn}$ respectivamente (μg);

$m_m^{ads}$ ($t_1$), $m_m^{ads}$ ($t_2$), ..., $m_n^{ads}$ ($t_n$) = masa de la sustancia medida en una alícuota v $v_a^A$ a los tiempos $t_1$, $t_2$,$t_n$ respectivamente (μg);

$m_s^{ads}$ (eq) = masa de la sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción (μg);

$m_{aq}^{ads}$ (eq) = masa de la sustancia en la solución en el equilibrio de adsorción (μg);

$v_a^A$ = volumen de la alícuota donde se mide la sustancia problema ($cm^3$);

$A_{\Delta ti}$ = adsorción porcentual correspondiente al intervalo de tiempo $\Delta t_i$ (%);

$A_{eq}$ = adsorción porcentual en el equilibrio de adsorción (%)

DESORCIÓN D (%)

El tiempo $t_0$ al que se inicia el experimento de cinética de desorción se considera que es el momento en que el volumen recuperado máximo de la solución de sustancia problema (después de alcanzarse el equilibrio de adsorción) es sustituido por un volumen igual de solución de $CaCl_2$0,01 M.

a) *Método paralelo*

A un tiempo $t_i$, la masa de la sustancia problema se mide en la fase acuosa tomada del tubo i ($V_r^i$), y la masa desor-bida se calcula con arreglo a la ecuación siguiente:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i}\right) - m_{aq}^{A} \quad (13)$$

En el equilibrio de desorción $t_i = t_{eq}$ por lo que $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

La masa de la sustancia problema desorbida durante un intervalo de tiempo ($At_i$) se da en la ecuación:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

La desorción porcentual se calcula:

— a un tiempo $t_i$ a partir de la ecuación:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \tag{15}$$

— y durante un intervalo de tiempo ($\Delta t_i$) a partir de la ecuación:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \tag{16}$$

donde:

$D_{ti}$ = desorción porcentual al tiempo $t_i$ (%),

$D_{\Delta ti}$ = desorción porcentual correspondiente al intervalo de tiempo $\Delta t_i$ (%),

$m_{aq}^{des}$ $(t_1)$ = masa de la sustancia problema desorbida al tiempo $t_i$ (μg),

$m_{aq}^{des}$ $(\Delta t_1)$ = masa de la sustancia problema desorbida durante el intervalo de tiempo $\Delta t_i$ (μg),

$m_m^{des}$ $(t_i)$ = masa de la sustancia problema medida analíticamente al tiempo $t_i$ en un volumen de solución $V_r^i$, que se toma para el análisis (μg),

$m_{aq}{}^{A}$ = masa de la sustancia problema que queda en solución una vez alcanzado el equilibrio de adsorción debido a la sustitución incompleta del volumen (μg).

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \tag{17}$$

$m_{aq}^{ads}$ (eq) = masa de la sustancia problema en la solución en el equilibrio de adsorción (μg),

$V_R$ = volumen de sobrenadante retirado del tubo después de que se haya alcanzado el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de una solución de $CaCl_2$0,01 M (cm

$V_r^i$ = volumen de solución tomado del tubo (i) para la medida de la sustancia problema, en el experimento de cinética de desorción ($cm^3$).

Los valores de desorción $D_t{}^i$ o $D_{\Delta t^i}$ (según las necesidades del estudio) se representan frente al tiempo y se determina el tiempo al que se alcanza el equilibrio de desorción.

b) *Método en serie*

Las siguientes ecuaciones tienen en cuenta que el procedimiento de adsorción presentado se ha seguido con mediciones de la sustancia problema en pequeñas alícuotas ($(v_a^A)$) de la fase acuosa (método en serie en el punto 1.9, «Realización de la prueba»). Se supone que: a) el volumen de sobrenadante retirado del tubo tras el experimento de cinética de adsorción se ha sustituido con el mismo volumen de solución de $CaCl_2$0,01 M ($V_R$), y b) el volumen total de fase acuosa en contacto con el suelo ($V_T$) durante el experimento de cinética de desorción se mantiene constante y viene dado por la ecuación:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \tag{18}$$

▼B

Al tiempo $t_i$:

— La masa de la sustancia problema se mide en una pequeña alícuota ($v_a^D$) y la masa desorbida se calcula con arreglo a la ecuación siguiente:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - \left(i-1\right) \cdot v_a^D)}{V_T}\right) \tag{19}$$

— Al equilibrio de desorción $t_i = t_{eq}$, por lo que $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$

— La desorción porcentual $D_{t_i}$ se calcula a partir de la ecuación siguiente:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \tag{20}$$

Al intervalo de tiempo ($\Delta t_i$):

Durante cada intervalo de tiempo, la cantidad de sustancia desorbida se calcula de la forma siguiente:

— para el primer intervalo de tiempo $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \tag{21}$$

— para el segundo intervalo de tiempo $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{(V_T - v_a^D)}{V_T}\right)$$

and

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \tag{22}$$

— para el enésimo intervalo de tiempo $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_T - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1, n\neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \tag{23}$$

Finalmente, la desorción porcentual a cada intervalo de tiempo, $D_{\Delta t_i}$, se calcula con la ecuación siguiente:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \tag{24}$$

mientras que la desorción porcentual $D_{t_i}$ al tiempo $t_i$ viene dada por la ecuación:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \tag{25}$$

▼B

definiéndose los parámetros utilizados de la forma siguiente:

$m^{des}_s(\Delta t_1)$, $m^{des}_s(\Delta t_2)$,... , $m^{des}_s(\Delta t_n)$ = masa de la sustancia que permanece adsorbida en el suelo tras los intervalos de tiempo $\Delta t_1$, $\Delta t_2$,..., $\Delta t_n$ respectivamente (μg),

$\overline{m}^{des}_s(\Delta t_1)$, $\overline{m}^{des}_s(\Delta t_2)$,... , $\overline{m}^{des}_s(\Delta t_n)$ = masa de la sustancia que permanece adsorbida en el suelo tras los intervalos de tiempo $\Delta t_1$, $\Delta t_2$,..., $\Delta t_n$ respectivamente (μg),

$\overline{m}^{des}_s(t_1)$, $\overline{m}^{des}_s(t_2)$,... , $\overline{m}^{des}_s(t_n)$ = masa de la sustancia medida en una alicuota ($v^D_a$) a los tiempo $t_1$,$t_2$,..., $t_n$, respectivamente (μg),

$V_T$ = volumen total de la fase acuosa en contacto con el suelo durante et el experimento de cinética de desorcióh realizado con el método en serie ($cm^3$),

$m^A_{aq}$ = masa de la sustancia problema que queda en solución una vez alcanzado el equilibr de adsorcióh debido a la sustitución incompleta del volumen (μg):

$$m^A_{aq} = \left( \frac{\left( V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i) \right) - V_R}{\left( V_0 - \sum_{i=1}^{n} v^A_a(i) \right)} \right) \cdot m^{ads}_{aq}(eq) \qquad (26)$$

$V_R$ = volumen de sobrenadante retirado del tubo después de alcanzar el equilibrio de adsorción y sustituido por el mismo volumen de solución de $CaCl_2$0,01 M ($cm^3$),

$v^D_a$ = volumen de la alícuota tomada del tubo para el análisis (i), durante el experimento de cinética de desorción realizado con el método en serie ($cm^3$):

$$v^D_a \leq 0{,}02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

*Apéndice 6*

**ADSORCIÓN-DESORCIÓN EN SUELOS: FICHAS DE COMUNICACIÓN DE DATOS**

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... °C

**Adecuación del método analítico**

| | | |
|---|---|---|
| Suelo pesado | g | |
| Suelo: masa seca | g | |
| Volumen de la solución de $CaCl_2$ | $cm^3$ | |
| Concentración final nominal sol de la solución | $\mu g\ cm^{-3}$ | |
| Concentración final analítica sol de la solución | $\mu g\ cm^{-3}$ | |

Principio del método analítico utilizado:

Calibración del método analítico:

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodología analítica seguida: Indirecta ☐ Paralela ☐ En serie ☐

Directa ☐

**Prueba de adsorción: muestras de ensayo**

| | Simbolo | Unidades | Tiempo equilibrado | | Tiempo de equilibrado | | Tiempo de equilibrado | | Tiempo de equilibrado | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N° tubo | | | | | | | | | | |
| Suelo pesado | — | g | | | | | | | | |
| Suelo: masa seca | $m_{soil}$ | g | | | | | | | | |
| Volumen de agua en el suelo pesado (calculado) | $V_{ws}$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen de solución *CaCl,* 0,01 M para equilibrar el suelo | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen de solución madre | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen total tic fase acuosa en contacto con el suelo | $V_o$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Concentración inicial de la solución problema | $C_o$ | $\mu g\ cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Masa de la sustancia problema ni inicio de la prueba | **m0** | µg | | | | | | | | |

▼B

| | Símbolo | Unidades | Tiempo equilibrado | | Tiempo de equilibrado | | Tiempo de equilibrado | | Tiempo de equilibrado | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Iras agitación y centrifugación** | | | | | | | | | | |
| MÉTODO INDIRECTO | | | | | | | | | | |
| Método paralelo | | | | | | | | | | |
| Concentración de la sustancia problema lase acuosa, incluida corrección por blanco | $C_{aq}^{ads}(t_i)$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Método en serie | | | | | | | | | | |
| Musa de la sustancia problema medida en la alícuota $V_a$ | $m_s^{ads}(t_i)$ | uµg | | | | | | | | |
| MÉTODO DIRECTO | | | | | | | | | | |
| Masa de la sustancia problema adsorbida en el suelo | $m_s^{ads}(t_i)$ | µg | | | | | | | | |
| Calculo de la adsorción | | | | | | | | | | |
| Adsorción | $A_{t_i}$ | % | | | | | | | | |
| | $A_{\Delta t_i}$ | % | | | | | | | | |
| Me-Jias | | | | | | | | | | |
| Coeficiente | $K_e$ | $cm^3\ g^{-1}$ | | | | | | | | |
| Medias | | | | | | | | | | |
| Coefidence | $K_{oc}$ | $cm^3\ g^{-1}$ | | | | | | | | |
| Medias | | | | | | | | | | |

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... °C

**Prueba de adsorción: blancos y control**

| | Símbolo | Unidad | Blanco | | Blanco | | Control | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| N° tubo | | | | | | | | |
| Suelo pesado | | g | | | | | 0 | 0 |
| Cantidad de agua en el suelo pesado (calculada) | | $cm^3$ | | | | | — | — |
| Volumen añadido de solución $CaCl_2$ 0,01 M | | $cm^3$ | | | | | | |
| Volumen añadido de la solución madre de le sustancia problema | | $cm^3$ | 0 | 0 | | | | |
| Volumen total de fase acuosa (calculado) | | $cm^3$ | | | | | — | — |

▼B

| | Símbolo | Unidad | Blanco | | Blanco | | Control | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentración inicial de la sustancia problema en la fase acuosa | | µg $cm^{-3}$ | | | | | | |
| **Tras agitación y centrifugación** | | | | | | | | |
| Concentración en la fase acuosa | | µg $cm^{-3}$ | | | | | | |

*Nota:* Añádanse columnas en caso necesario.

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... °C

**Balance de masa**

| | Símbolo | Unidad | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Nº tubo | | | | | | |
| Suelo pesado | — | g | | | | |
| Suelo: masa seca | $m_{soil}$ | g | | | | |
| Volumen de agua en suelo pesado (calculado) | $V_{ws}$ | ml | | | | |
| Volumen sol de la solución de $CaCl_2$ 0,01 M para equilibrar el suelo | | ml | | | | |
| Volumen de solución madre | | $cm^3$ | | | | |
| Volumen total de fase acuosa en contacto con el suelo | $V_0$ | $cm^3$ | | | | |
| Concentración inicial de la solución problema | $C_0$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Tiempo de equilibrado | — | h | | | | |
| **Tras agitación y centrifugación** | | | | | | |
| Concentración de la sustancia problema en fase acuosa en equilibrio adsorción, incluida corrección por blanco | $C_{aq}^{ads}(eq)$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Tiempo de equilibrado | $t_{eq}$ | h | | | | |
| 1ª dilución con solvente | | | | | | |
| Volumen retirado fase acuosa | $V_{rec}$ | $cm^3$ | | | | |
| Volumen añadido solvente | $\Delta V$ | $cm^3$ | | | | |
| 1ª extracción con solvente | | | | | | |
| Señal analizada en fase solvente | $S_{E1}$ | var. | | | | |
| Concentración de la sustancia problema en solvente | $C_{E1}$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |

▼B

| | Símbolo | Unidad | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Masa sustancia extraída del suelo y paredes recipiente | $m_{E1}$ | µg | | | | |
| 2ª dilución con solvente | | | | | | |
| Volumen retirado solvente | $\Delta V_5$ | $cm^3$ | | | | |
| Volumen añadido solvente | $\Delta V$ | $cm^3$ | | | | |
| 2ª extracción con solvente | | | | | | |
| Señal analizada en fase solvente | $S_{E2}$ | var | | | | |
| Concentración de la sustancia problema en sol-vente | $C_{E2}$ | µg $cm^{-3}$ | | | | |
| Masa sustancia extraída del suelo y paredes recipiente | $m_{E2}$ | µg | | | | |
| Total masa sustancia problema extraída en dos pasos | $m_E$ | µg | | | | |
| Balance de masa | MB | % | | | | |

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 ºC, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... ºC

**Isotermas de adsorción**

| | Símbol | Unidad | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nº tubo | | | | | | | | | | |
| Suelo pesado | — | g | | | | | | | | |
| Suelo: masa seca | E | g | | | | | | | | |
| Volumen de agua en suelo pesado (calculado) | $V_{ws}$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen de la solución de $CaCl_2$0,01 M para equilibrar el suelo | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen de solución madre añadido | | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Volumen total de fase acuosa en contacto con suelo (calculado) | $V_0$ | $cm^3$ | | | | | | | | |
| Concentración solución | $C_0$ | Mg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Tiempo de equilibrado | — | h | | | | | | | | |

▼B

| | Símbol | Unidad | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Tras agitación y centrifugación** | | | | | | | | | | |
| Concentración de la sustan-cia en fase acuosa, incluida corrección por blanco | $C_{aq}^{ads}(eq)$ | µg $cm^{-3}$ | | | | | | | | |
| Temperatura | | °C | | | | | | | | |
| Masa adsorbida por unidad suelo | $C_{s}^{ads}(eq)$ | µg $g^{-1}$ | | | | | | | | |

Análisis de regresión:

valor de $K_F^{ads}$:

valor de 1/n:

coeficiente de regresión $r^2$:

Sustancia estudiada:

Suelo estudiado:

Contenido en masa seca del suelo (105 °C, 12 horas): ..... %

Temperatura: ..... °C

Metodología analítica seguida: Indirecta ☐ Paralela ☐ En serie ☐

**Prueba de desorción**

| | | Símbolo | Unidades | Intervalo de tiempo | Intervalo de tiempo | Intervalo de tiempo | Intervalo de tiempo |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nº tubo de la fase de adsorción | | | | | | | |
| Masa de sustancia adsorbida en el suelo en el equilibrio de adsorción | | $m_s^{ads}(eq)$ | µg | | | | |
| Volumen retirado de fase acuosa, sustituido por $CaCl_2$0,01 M | | $V_R$ | $cm^3$ | | | | |
| Volumen total de fase acuosa en contacto con suelo | PM SM | $V_0$ | $cm^3$ | | | | |
| | SM | $V_T$ | $cm^3$ | | | | |
| Masa de la sustancia problema que queda en la solución una vez alcanzado el equilibrio de adsorción debido a sustitución incompleta del volumen | | $m_{aq}^{A}$ | µg | | | | |
| **Cinética de desorción** | | | | | | | |
| Masa medida de sustancia desorbida del suelo al tiempo $t_i$ | | $m_m^{des}(t_i)$ | µg | | | | |
| Volumen de solución tomado del tubo (i) para medir la sustancia problema | PM | $^{V1}{}_r$ | $cm^3$ | | | | |
| | SM | | $cm^3$ | | | | |
| Masa de sustancia desorbida del suelo al tiempo $t_i$ (calculada) | | $m_{aq}^{des}(t_i)$ | µg | | | | |
| Masa de sustancia desorbida del suelo durante el intervalo de tiempo $\Delta t_i$ (calculada) | | $m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ | µg | | | | |

▼B

| | Símbolo | Unidades | Intervalo de tiempo | Intervalo de tiempo | Intervalo de tiempo | Intervalo de tiempo |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Desorción porcentual** | | | | | | |
| Desorción al tiempo $t_i$ | | % | | | | |
| Desorción al intervalo de tiempo $\Delta t_i$ | | % | | | | |
| Coeficiente de desorción aparente | | | | | | |

PM: Método paralelo.

SM: Método en serie.

▼B

## C.19. CALCULO DEL COEFICIENTE DE ADSORCIÓN ($K_{OC}$) EN SUELOS Y EN LODOS DE AGUAS RESIDUALES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

### 1. MÉTODO

El presente método de ensayo reproduce las directrices del documento TG 121 de la OCDE (2000).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El comportamiento que presentan los compuestos en cuanto a su adsorción en suelos o en lodos de agua; residuales puede describirse mediante ciertos parámetros, para cuya determinación experimental se puede aplicar el método de ensayo C.18. Un parámetro importante es el coeficiente de adsorción, definido como la relación entre la concentración del compuesto en la muestra de suelo o lodo y la concentración del mismo en la fase acuosa, cuando la adsorción llega al equilibrio. El coeficiente de adsorción normalizado con respecto a contenido de carbono orgánico presente en el suelo, $K_{oc}$, constituye un útil indicador de la capacidad que presenta un producto químico para unirse a la materia orgánica de los suelos o los lodos de aguas residuales; este valor permite establecer comparaciones entre los diversos productos químicos. Se puede calcular este parámetro a través de correlaciones con la hidrosolubilidad y con el coeficiente de reparto n-octanol/agua (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

El método experimental descrito en este ensayo hace uso de una técnica de HPLC para calcular el coeficiente de adsorción, $K_{oc}$, en suelos y lodos de aguas residuales (8). La fiabilidad de los valores así obtenidos es superior a la de los cálculos efectuados por QSAR (9). Como método de cálculo, no puede sustituir completamente a los experimentos de equilibrio de lotes contemplados en el método de ensayo C.18. A pesar de ello, el $K_{oc}$ calculado puede ser útil para escoger los parámetros de ensayo adecuados en los estudios de adsorción/desorción que siguen el método de ensayo C.18 calculando los valores $K_d$ (coeficiente de distribución) o $K_f$ (coeficiente de adsorción de Freundlich) según la ecuación 3 (véase el punto 1.2 a continuación).

### 1.2. DEFINICIONES

**$K_d$**: coeficiente de distribución, que se define como la relación existente entre las concentraciones en el equilibrio (C) de una sustancia problema disuelta en un sistema de dos fases: un adsorbente (suelo o lodo) más una fase acuosa; es un valor adimensional, cuando las concentraciones en ambas fases se expresan como peso/peso. Si la concentración del compuesto en la fase acuosa viene expresada como peso/volumen, las unidades de $K_d$ son ml $g^{-1}$. $K_d$ puede variar en función de las propiedades del adsorbente.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \; o \; \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \qquad (1)$$

donde:

$C_{soil}$ = concentración de la sustancia problema en el suelo *(soil),* una vez alcanzado el equilibrio (μg . $g^{-1}$)

$C_{sludge}$ = concentración de la sustancia problema en el lodo *(sludge),* una vez alcanzado el equilibrio (μg . $g^{-1}$)

$C_{aq}$ = concentración de la sustancia problema en la fase acuosa, una vez alcanzado el equilibrio (μg . $g^{-1}$) μg . $ml^{-1}$).

▼B

**$K_f$:** coeficiente de adsorción de Freundlich, que se define como la concentración de la sustancia problema en el suelo o en el lodo de aguas residuales *(x/m)* cuando la concentración en la fase acuosa, llegado el equilibrio$_{aq}$, toma el valor 1; unidades: µg . $g^{-1}$ de adsorbente. El valor puede variar en función de las propiedades del adsorbente.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

donde:

x/m = cantidad de sustancia problema *x* (µg $g^{-1}$) adsorbida por masa de adsorbente m (g), en el equilibrio,

1/n = pendiente de la isoterma de adsorción de Freundlich,

$C_{aq}$ = concentración de la sustancia problema en la fase acuosa, en el equilibrio (µg $ml^{-1}$).

$$\text{At}C_{aq} = 1;\ \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

Cuando

**$K_{oc}$:** coeficiente de distribución ($K_d$) o coeficiente de adsorción de Freundlich ($K_f$) normalizado con respecto al contenido de carbono orgánico ($f_{oc}$) de un adsorbente; en el caso particular de productos químicos no ionizados, resulta un indicador aproximado para conocer la magnitud de la adsorción de un compuesto y permite establecer comparaciones entre diversos productos químicos. Según sean las dimensiones de $K_d$ y $K_f$, $K_{oc}$ puede ser adimensional o bien venir expresado en las unidades siguientes: ml . $g^{-1}$ o µg . $g^{-1}$ de materia orgánica.

$$\text{Koc} = \frac{\text{Kd}}{\text{foc}} \text{ (adimensional o ml} \cdot g^{-1}) \text{ o bien } \frac{\text{Kf}}{\text{foc}} (\mu g \cdot g^{-1}) \quad (3)$$

La relación entre los coeficientes $K_{oc}$ y $K_d$ no siempre es lineal; así pues, la posible diferencia de los valores de $K_{oc}$ entre uno y otro suelo es muy reducida, en comparación con la de los valores $K_d$ o $K_f$.

A partir del coeficiente de distribución másica (k'), empleando un gráfico de calibración de log k' frente a log $K_{oc}$ (registrado con los compuestos de referencia elegidos), se deduce el coeficiente de adsorción ($K_{oc}$).

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

donde:

$t_R$ = tiempo de retención (en el cromatograma de HPLC) del compuesto problema o del compuesto de referencia (minutos),

$t_0$ = tiempo de retención de la fase móvil en la columna de HPLC (minutos) (véase el punto 1.8.2).

$P_{ow}$ coeficiente de reparto octanol/agua, que se define como el cociente entre la concentración de la sustancia disuelta en n-octanol y la concentración de la misma disuelta en la fase acuosa; se trata de un valor adimensional.

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coctanol}}{\text{Caq}} (= \text{Kow}) \quad (5)$$

1.3. COMPUESTOS DE REFERENCIA

Es necesario conocer, antes de aplicar el método, cuál es la fórmula estructural del compuesto, así como su pureza y su constante de disociación (en caso pertinente). Resulta útil contar con datos adicionales tales como la solubilidad en agua y, en disolventes orgánicos, el coeficiente de reparto octanol/agua y las características de hidrólisis.

▼B

A fin de establecer una correlación entre los datos de retención obtenidos mediante HPLC, relativos a la sustancia problema, y el coeficiente de adsorción de la misma, $K_{oc}$, se debe trazar un gráfico de calibración (log $K_{oc}$ frente a log k'). Se empleará un mínimo de 6 puntos de referencia, al menos uno de ellos por encima y otro por debajo del valor previsto para la sustancia problema. La exactitud del método mejorará significativamente si se emplean compuestos de referencia que guarden una relación estructural con la sustancia problema. Si el analista no cuenta con este tipo de datos, deberá ser él quien elija los compuestos adecuados para la calibración. En tal caso, se optará por una serie más general de compuestos heterogéneos desde el punto de vista estructural. En el apéndice figura una lista de compuestos y de valores de $K_{oc}$ aplicables para los análisis de lodos de aguas residuales (cuadro 1) o de suelos (cuadro 3). La elección de otros compuestos para la calibración deberá ser justificada.

1.4. PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se lleva a cabo una HPLC en columnas analíticas rellenas de una fase sólida de tipo cianopropilo, de las disponibles en el mercado, que contiene tanto grupos lipófilos como grupos polares. Se utiliza una fase estacionaria moderadamente polar basada en una matriz de sílice:

| | | |
|---|---|---|
| — O — Si | — $CH_2$ — $CH_2$ — $CH_2$ | — CN |
| silice | grupo apolar separador | grupo polar |

El principio del método de ensayo es similar al del método de ensayo A.8 (coeficiente de reparto, método de HPLC). Al ir atravesando la columna, junto con la fase móvil, la sustancia problema interacciona con la fase estacionaria. Como resultado del reparto entre la fase móvil y la fase estacionaria, la sustancia problema experimenta una retención. La composición ambifílica de la fase estacionaria (partes polares y partes apolares) permite una interacción de los diversos grupos polares o apolares de cada molécula similar a la que tiene lugar en el caso de la materia orgánica en matrices tales como lodos de aguas residuales o suelos. Este hecho posibilita establecer una relación entre el tiempo de retención en la columna y el coeficiente de adsorción en la materia orgánica.

El pH ejerce una significativa influencia sobre la adsorción, particularmente en el caso de los compuestos polares. En el caso de suelos de cultivo o tanques de plantas de tratamiento de aguas residuales, el pH suele estar comprendido entre 5,5 y 7,5. Cuando se desea analizar compuestos ionizables, se debe llevar a cabo un ensayo con la forma ionizada y otro con la no ionizada, empleando las soluciones tampón adecuadas, aunque solo en aquellos casos en que al menos el 10 % del compuesto analizado se disocie a un pH de entre 5,5 y 7,5.

Para la evaluación se utiliza exclusivamente la relación entre la retención en la columna de HPLC y el coeficiente de adsorción, de modo que no es preciso aplicar un método de análisis cuantitativo: tan solo es necesario determinar el tiempo de retención. Si se dispone de una serie adecuada de compuestos de referencia y es posible aplicar las condiciones experimentales normales, el método constituye un modo rápido y eficaz para calcular el coeficiente de adsorción, $K_{oc}$.

1.5. APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método de HPLC es aplicable a aquellos productos químicos (marcados o no) para los cuales se disponga de un sistema de detección apropiado (por ejemplo, un espectrofotómetro, un detector de radiactividad) y que sean suficientemente estables durante todo el experimento. Puede resultar especialmente útil para analizar productos químicos cuyo estudio sea difícil mediante otros sistemas experimentales (compuestos volátiles, compuestos cuya solubilidad en agua no alcance una concentración que pueda determinarse desde el punto de vista analítico, compuestos con una elevada afinidad por la superficie de los sistemas de incubación). Se puede utilizar este método para analizar mezclas que originen al eluir bandas sin resolución. En este caso, se debe definir un margen de límites superior e inferior para los valores de log $K_{oc}$ correspondientes a los compuestos de la mezcla problema.

▼B

La presencia de impurezas puede dificultar a veces la interpretación de los resultados de la HPLC; no obstante, su importancia será de índole menor en la medida en que se cuente con análisis que permitan identificar con claridad la sustancia problema y distinguirla de las impurezas.

Se ha validado el uso del método para analizar las sustancias citadas en el cuadro 1 del apéndice; igualmente, el método ha sido aplicado al análisis de muchos otros productos químicos comprendidos en las familias químicas siguientes:

— aminas aromáticas (por ejemplo, trifluralina, 4-cloroanilina, 3,5-dinitroanilina, 4-metilanilina, N-metilani-lina, l-naftilamina),

— ésteres de ácidos carboxílicos aromáticos (por ejemplo, benzoato de metilo, 3,5-dinitrobenzoato de etilo),

— hidrocarburos aromáticos (por ejemplo, tolueno, xileno, etilbenceno, nitrobenceno),

— ésteres de ácidos ariloxifenoxipropiónicos (por ejemplo, metil diclofop, etil fenoxaprop, P-etil fenoxaprop),

— fungicidas con estructura de tipo imidazol o benzimidazol (por ejemplo, carbendazima, fuberidazol, tria-zóxido),

— amidas de ácidos carboxílicos (por ejemplo, 2-clorobenzamida, N,N-dimetilbenzamida, 3,5-dinitrobenza-mida, N-metilbenzamida, 2-nitrobenzamida, 3-nitrobenzamida),

— hidrocarburos clorados (por ejemplo, endosulfán, DDT, hexaclorobenceno, quintoceno, 1,2,3-tricloroben-ceno),

— insecticidas organofosforados (por ejemplo, metil azinfos. disulfotón, fenamifos, isofenfos, pirazofos, sul-profos, triazofos),

— fenoles (por ejemplo, fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentaclorofenol, 2.4,6-triclorofenol, 1-naftol),

— derivados de la fenilurea (por ejemplo, isoproturón, monolinurón, pencicurón),

— colorantes (por ejemplo, Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81),

— hidrocarburos poliaromáticos (por ejemplo, acenafteno, naftaleno),

— herbicidas con estructura de 1,3,5-triazina (por ejemplo, prometrina, propazina, simazina, terbutrina),

— derivados de tipo triazol (por ejemplo, tebuconazol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

No es aplicable el método a aquellas sustancias que den lugar a una reacción con el eluyente o con la fase estacionaria. Tampoco a aquellas sustancias que interaccionen con componentes inorgánicos de modo específico (por ejemplo, las que formen complejos en racimo con los minerales de las arcillas). Puede ocurrir que el método no sirva en el caso de tensioactivos, compuestos inorgánicos y ácidos y bases orgánicos moderados o fuertes. Es posible determinar valores de log $K_{oc}$ comprendidos entre 1,5 y 5,0. Para analizar compuestos ioni-zables, se debe emplear una fase móvil tamponada; no obstante, se tendrá cuidado de evitar que los componentes del tampón o la sustancia problema precipiten.

▼B

1.6. CRITERIOS DE CALIDAD

1.6.1. **Exactitud**

Normalmente, se puede calcular que el coeficiente de adsorción de una sustancia problema estará comprendido en el intervalo de ± 0,5 unidades logarítmicas del valor determinado por el método de equilibrio de lotes (véase el cuadro 1 del apéndice). Es posible lograr una mayor exactitud si los compuestos de referencia empleados guardan una relación estructural con la sustancia problema.

1.6.2. **Repetibilidad**

Se debe efectuar al menos un duplicado de cada determinación. Los valores de log $K_{oc}$ obtenidos a partir de cada medición deben encontrarse en un intervalo de 0,25 unidades logarítmicas.

1.6.3. **Reproducibilidad**

La experiencia hasta ahora adquirida en la aplicación del método confirma la validez del mismo. Un estudio del método de HPLC, en el que se utilizaron 48 sustancias (plaguicidas en su mayoría) para las que se disponía de datos fiables respecto al $K_{oc}$ en suelos, dio como resultado un coeficiente de correlación R = 0,95 (10) (11).

Con objeto de mejorar y validar el método, se llevó a cabo un ensayo comparativo en el que participaron 11 laboratorios (12). Los resultados están recogidos en el cuadro 2 del apéndice.

1.7. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.7.1. **Estimación preliminar del coeficiente de adsorción**

Tanto el coeficiente de reparto octanol/agua $P_{ow}$ (= $K_{ow}$) como, en cierta medida, la hidrosolubilidad pueden servir de indicadores del grado de adsorción, particularmente en el caso de compuestos no ionizados, de modo que pueden ser utilizados para prever la gama de valores. Existen numerosas correlaciones útiles publicadas, relativas a varios grupos de productos químicos (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7).

1.7.2. **Aparato**

Se debe disponer de un cromatógrafo de líquidos equipado con una bomba continua y un detector adecuado. Es conveniente utilizar una válvula de inyección junto con un bucle al efecto. Se emplearán resinas comerciales con grupos cianopropílicos enlazados covalentemente a un sustrato de sílice (por ejemplo, Hypersil y Zor-bax CN). Se puede intercalar una precolumna del mismo material entre el sistema de inyección y la columna en la que se realiza el análisis. Puede existir una considerable variabilidad entre las columnas que procedan de diferentes proveedores, manifestada en su eficacia para lograr la separación. Se deberán lograr los siguientes coeficientes de distribución másica, k', expuestos aquí como valores orientativos: log k' > 0,0 cuando log $K_{oc}$ = 3,0, y log k' > - 0,4 for cuando log $K_{oc}$ = 2,0, al emplear como fase móvil una mezcla de metanol/agua (55 %/45 %).

1.7.3. **Fases móviles**

Se han estudiado varias fases móviles: se recomienda utilizar las dos siguientes:

— metanol/agua (55 %/45 % v/v),

— metanol/tampón de citrato 0,01M (pH = 6,0), (55 %/45 % v/v).

▼B

Para preparar el disolvente de elución, se emplea una mezcla de metanol para HPLC y agua destilada o tampón de citrato. La mezcla se desgasifica antes de ser utilizada. Se efectuará una elución isocrática. En el caso de que las mezclas de metanol/agua no sean apropiadas, es posible investigar mezclas de otros disolventes con agua, por ejemplo etanol/agua o bien acetonitrilo/agua. En el caso de compuestos ionizables, se recomienda emplear una solución tampón a fin de estabilizar el pH. Se debe procurar evitar la precipitación de sales y el deterioro de la columna, situaciones posibles al utilizar algunas mezclas de fase orgánica + tampón.

No es posible incluir aditivos tales como reactivos tipo par iónico, ya que pueden alterar las características de adsorción de la fase estacionaria. Tales alteraciones de la fase estacionaria pueden ser irreversibles. Así pues, los experimentos en los que intervengan aditivos deben ser realizados en columnas independientes.

1.7.4. **Solutos**

Se utilizará la fase móvil para disolver tanto la sustancia problema como los compuestos de referencia.

1.8. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.8.1. **Condiciones de ensayo**

Se registrará la temperatura a la que se realizan las mediciones. Es muy conveniente servirse de un compartimento termostatizado para la columna, para garantizar la constancia de las condiciones en que transcurre la calibración y las cromatografías para los cálculos o las mediciones de la sustancia problema.

1.8.2. **Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, $t_0$**

Para determinar el tiempo de retención de la fase móvil, $t_0$, se pueden emplear dos métodos distintos (véase también el punto 1.2).

1.8.2.1. *Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, $t_0$, mediante una serie homóloga*

Se ha demostrado que este procedimiento da lugar a valores de $t_0$ fiables y normalizados. Véase información detallada en el método de ensayo A.8: coeficiente de reparto (n-octanol/agua), método de HPLC.

1.8.2.2. *Determinación del tiempo de retención de la fase móvil, $t_0$, utilizando compuestos inertes no retenidos por la columna*

Esta técnica consiste en inyectar soluciones de formamida, urea o nitrato de sodio. Se debe efectuar al menos un duplicado de cada medición.

1.8.3. **Determinación de los tiempos de retención, $t_R$**

Se elegirán compuestos de referencia conforme a lo descrito en el punto 1.3. Se puede efectuar una inyección de los mismos a modo de patrón mixto para determinar sus tiempos de retención, siempre que se haya confirmado que no existen interferencias recíprocas que alteren estos valores. Periódicamente, al menos 2 veces al día, se llevará a cabo una calibración, para tener en cuenta las potenciales variaciones imprevistas en cuanto a la eficacia de la columna. Una práctica muy adecuada consiste en efectuar las inyecciones de calibración tanto antes como después de inyectar la sustancia problema, al objeto de confirmar que no hayan variado los tiempos de retención. Se inyecta por separado cada sustancia problema, en cantidades tan reducidas como sea posible (para evitar una sobrecarga de la columna) y se procede a determinar sus tiempos de retención.

▼B

Para lograr una mayor fiabilidad de las mediciones, se realizará al menos un duplicado de cada determinación. Los valores de log $K_{oc}$ obtenidos a partir de cada medición deben encontrarse en un intervalo de 0,25 unidades logarítmicas.

1.8.4. **Evaluación**

A partir del tiempo de retención de la fase móvil, $t_0$, y de los tiempos de retención de los compuestos de referencia elegidos, $t_R$, se calculan los coeficientes de distribución másica, $k'$ aplicando la ecuación 4 (véase el punto 1.2). A continuación, se traza un gráfico en el que se representan los datos relativos al valor log k' de los compuestos de referencia frente a los respectivos valores log $K_{oc}$ procedentes de los experimentos de equilibrio de lotes, mostrados en los cuadros 1 y 3 del apéndice. Interpolando en este gráfico el valor log k' correspondiente a cada sustancia problema, se obtiene entonces el respectivo valor log $K_{oc}$. Si los resultados reales indican que el log $K_{oc}$ de la sustancia problema se sale del intervalo de calibración, se debe repetir el ensayo, empleando en este caso otros compuestos de referencia más apropiados.

2. **DATOS E INFORME**

El informe debe incluir la información siguiente:

— identidad y pureza de la sustancia problema y de los compuestos de referencia, así como valores de pKa en caso de que sea relevante.

— descripción del equipo y de las condiciones de trabajo, por ejemplo: tipo y dimensiones de la columna en la que se efectúa el análisis (y de la precolumna), medios de detección, fase móvil (proporción de los distintos componentes, pH), intervalo de temperaturas durante las mediciones,

— tiempo de retención de la fase móvil y método empleado para determinarlo,

— cantidades de la sustancia problema y de los compuestos de referencia introducidas en la columna,

— tiempos de retención de los compuestos de referencia utilizados para la calibración,

— representación gráfica y detalles relativos a la recta de regresión ajustada (log k' frente a log $K_{oc}$),

— datos sobre la retención media y valor log $K_{oc}$ calculado para el compuesto problema,

— cromatogramas.

3. **REFERENCIAS**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient ($K_{oc}$) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 167.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050-1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol, 17, pp. 227-231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297-312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831-832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, pp. 83 3-846.

(8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.

(9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), pp. 2493-2504.

(10) W. Kördel,). Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), pp. 2341-2352.

(11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

*Apéndice*

*Cuadro 1*

**Comparación entre los valores de $K_{oc}$ observados en suelos y en lodos de aguas residuales y los datos calculados aplicando el método de HPLC** (1) (2)

| Compuesto | Nº CAS | log $K_{oc}$ (lodos) | log $K_{oc}$ (HPLC) | Δ | log $K_{OC}$ (suelos) | Log $K_{OC}$ (HPLC) | Δ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Atrazina | 1912-24-9 | 1,66 | 2,14 | 0,48 | 1,81 | 2,20 | 0,39 |
| Linurón | 330-55-2 | 2,43 | 2,96 | 0,53 | 2,59 | 2,89 | 0,30 |
| Fentión | 55-38-9 | 3,75 | 3,58 | 0,17 | 3,31 | 3,40 | 0,09 |
| Monurón | 150-68-5 | 1,46 | 2,21 | 0,75 | 1,99 | 2,26 | 0,27 |
| Fenantreno | 85-01-8 | 4,35 | 3,72 | 0,63 | 4,09 | 3,52 | 0,57 |
| Benzoato de fenilo | 93-99-2 | 3,26 | 3,03 | 0,23 | 2,87 | 2,94 | 0,07 |
| Benzamida | 55-21-0 | 1,60 | 1,00 | 0,60 | 1,26 | 1,25 | 0,01 |
| 4-Nitrobenzamida | 619-80-7 | 1,52 | 1,49 | 0,03 | 1,93 | 1,66 | 0,27 |
| Acetanilida | 103-84-4 | 1,52 | 1,53 | 0,01 | 1,26 | 1,69 | 0,08 |
| Anilina | 62-53-3 | 1,74 | 1,47 | 0,27 | 2,07 | 1,64 | 0,43 |
| 2,5-Dichloroanilina | 95-82-9 | 2,45 | 2,59 | 0,14 | 2,55 | 2,58 | 0,03 |

(1) W Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), pp. 121-128.
(2) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges Chemosphere, 35 (1/2), pp. 107-119.

*Cuadro 2*

**Resultados de un estudio comparativo, realizado en diferentes laboratorios para mejorar y validar el método de HPLC** (1) **(11 laboratorios participantes)**

| Compuesto | Nº CAS | log $K_{oc}$ | $K_{oc}$ | log $K_{oc}$ |
|---|---|---|---|---|
| | | (OCDE 106) | (método de HPLC) | |
| Atrazina | 1912-24-9 | 1,81 | 78 ± 16 | 1,89 |
| Monuron | 150-68-5 | 1,99 | 100 ± 8 | 2,00 |
| Triapentenol | 77608-88-3 | 2,37 | 292 ± 58 | 2,47 |
| Linuron | 330-55-2 | 2,59 | 465 ± 62 | 2,67 |
| Fention | 55-38-9 | 3,31 | 2062 ± 648 | 3,31 |

(1) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), pp. 1373-1384.

▼B

*Cuadro 3*

**Compuestos de referencia recomendados para aplicar el método de HPLC conforme a los datos de adsorción a los suelos**

| Compuesto de referencia | Nº CAS | log $K_{OC}$ (valores promedio), equilibrio de lotes | Nº de datos ($K_{OC}$) | log de la desviación estándar | Fuente |
|---|---|---|---|---|---|
| Acetanilida | 103-84-4 | 1,25 | 4 | 0,48 | (a) |
| Fenol | 108-95-2 | 1,32 | 4 | 0,70 | (a) |
| 2-Nitrobenzamida | 610-15-1 | 1,45 | 3 | 0,90 | (b) |
| N, N-dimetilbenzamida | 611-74-5 | 1,52 | 2 | 0,45 | (a) |
| 4-Metilbenzamida | 619-55-6 | 1,78 | 3 | 1,76 | (a) |
| Benzoato de metilo | 93-58-3 | 1,80 | 4 | 1,08 | (a) |
| Atrazina | 1912-24-9 | 1,81 | 3 | 1,08 | (c) |
| Isoproturón | 34123-59-6 | 1,86 | 5 | 1,53 | (c) |
| 3-Nitrobenzamida | 645-09-0 | 1,95 | 3 | 1,31 | (b) |
| Anilina | 62-53-3 | 2,07 | 4 | 1,73 | (a) |
| 3,5-Dinitrobenzamida | 121-81-3 | 2,31 | 3 | 1,27 | (b) |
| Carbendazima | 10605-21-7 | 2,35 | 3 | 1,37 | (c) |
| Triadimenol | 55219-65-3 | 2,40 | 3 | 1,85 | (c) |
| Triazóxido | 72459-58-6 | 2,44 | 3 | 1,66 | (c) |
| Triazofos | 24017-47-8 | 2,55 | 3 | 1,78 | (c) |
| Linurón | 330-55-2 | 2,59 | 3 | 1,97 | (c) |
| Naftaleno | 91-20-3 | 2,75 | 4 | 2,20 | (a) |
| Endosulfán-diol | 2157-19-9 | 3,02 | 5 | 2,29 | (c) |
| Metiocarb | 2032-65-7 | 3,10 | 4 | 2,39 | (c) |
| Acid Yellow 219 | 63405-8 5-6 | 3,16 | 4 | 2,83 | (a) |
| 1,2,3-Triclorobenceno | 87-61-6 | 3,16 | 4 | 1,40 | (a) |
| γ-HCH | 58-89-9 | 3,23 | 5 | 2,94 | (a) |
| Fention | 55-38-9 | 3,31 | 3 | 2,49 | (c) |
| Direct Red 81 | 2610-11-9 | 3,43 | 4 | 2,68 | (a) |
| Pirazofos | 13457-18-6 | 3,65 | 3 | 2,70 | (c) |
| α-Endosulfán | 959-98-8 | 4,09 | 5 | 3,74 | (c) |
| Metil diclofop | 51338-27-3 | 4,20 | 3 | 3,77 | (c) |
| Fenantreno | 85-01-8 | 4,09 | 4 | 3,83 | (a) |
| Basic Blue 41 (mezcla) | 26850-47-5 122,0-13-2 | 4,89 | 4 | 4,46 | (a) |
| DDT | 50-29-3 | 5,63 | 1 | — | (b) |

(a) W. Kördel. J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No 106 01044 (1994).
(b) B.V. Oepen. W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.
(c) Datos facilitados por la industria.

▼M7

## C.20. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN EN *DAPHNIA MAGNA*

### INTRODUCCIÓN

El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 211 de la OCDE (2012). Las directrices de ensayo de la OCDE se revisan periódicamente en función de los avances científicos. Las directrices de ensayo de reproducción 211 tienen su origen en las directrices de ensayo 202, parte II, ensayo de reproducción en *Daphnia* sp. (1984). En general, se había reconocido que los datos obtenidos con ensayos realizados según las TG 202 podían ser variables. Esto dio lugar a que se dedicara un considerable esfuerzo a la identificación de las razones de esta variabilidad, con objeto de conseguir un método de ensayo mejor. Las directrices de ensayo 211 se basan en el resultado de estas actividades de investigación, estudios interlaboratorios y estudios de validación efectuados en 1992 (1), 1994 (2) y 2008 (3).

Las principales diferencias entre la versión inicial (TG 202, 1984) y la segunda versión (TG 211, 1998) de las directrices de ensayo de reproducción son las siguientes:

— la especie recomendada es *Daphnia magna*;

— la duración del ensayo es de 21 días;

— en ensayos semiestáticos, el número de animales utilizado en cada concentración de ensayo se ha reducido desde al menos 40 animales, de preferencia divididos en 4 grupos de 10, hasta al menos 10 animales mantenidos por separado (aunque pueden utilizarse diseños diferentes para los ensayos dinámicos);

— se han formulado recomendaciones más específicas en materia de medio de ensayo y condiciones de la alimentación.

— Las principales diferencias entre la segunda versión de las directrices de ensayo de reproducción (TG 211, 1998) y la presente versión son las siguientes:

— Se ha añadido el apéndice 7 para describir procedimientos para la identificación del sexo de los animales recién nacidos, en caso necesario; en consonancia con las versiones anteriores del presente método de ensayo, la proporción de machos y hembras es un parámetro opcional.

— La variable de respuesta del número de descendientes vivos producidos por cada animal parental superviviente se ha complementado con otra variable de respuesta de reproducción de dafnias, que es el número total de descendientes vivos producidos al final del ensayo por cada dafnia parental al comienzo del ensayo, excluyendo del análisis la mortalidad parental fortuita o inadvertida. El objetivo de la adición de esta variable de respuesta es alinearse con otros métodos de ensayo de reproducción de invertebrados. Además, en relación con esta variable de respuesta, es posible eliminar una fuente de error en el presente método de ensayo, a saber, el efecto de la mortalidad parental fortuita o inadvertida, en caso de que ocurra durante el período de exposición.

— Se han incluido orientaciones estadísticas adicionales para el diseño del ensayo y el tratamiento de los resultados, tanto en relación con la $EC_x$ (p. ej., $EC_{10}$ o $EC_{50}$) como con el enfoque de NOEC/LOEC.

— Se ha introducido un ensayo límite.

En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

La principal finalidad de este ensayo es evaluar el efecto de los productos químicos sobre el resultado reproductor de *Daphnia magna*. A tal fin, se exponen al producto problema, añadido al agua a una gama de concentraciones diferentes, hembras jóvenes de dafnia (animales parentales), con una edad inferior a 24 horas al principio del ensayo. La duración del ensayo es de 21 días. Al final del ensayo se evalúa el número total de descendientes vivos producidos. El resultado reproductor de los animales parentales se puede expresar de otras formas (por ejemplo, como número de descendientes vivos producidos por animal y por día a partir del primer día en que se observa descendencia), pero estas

▼M7

deben indicarse además del número total de descendientes vivos producidos al final del ensayo. A causa del particular diseño del ensayo semiestático en comparación con otros métodos de ensayo de reproducción de invertebrados, también es posible contar el número de descendientes vivos producidos por cada animal parental. Esto permite que, contrariamente a otros métodos de ensayo de reproducción de invertebrados, si el animal parental muere de forma fortuita o inadvertida durante el período de ensayo, su descendencia producida pueda excluirse de la evaluación de los datos. Por tanto, si se da mortalidad de animales parentales en réplicas expuestas, debe considerarse si la mortalidad sigue o no una pauta de respuesta a la concentración, por ejemplo si hay una regresión significativa de la respuesta frente a la concentración del producto problema con pendiente positiva (podría utilizarse para ello un método estadístico como la prueba de tendencia de Cochran-Armitage). Si la mortalidad no sigue una pauta de respuesta a la concentración, entonces esas réplicas con mortalidad de animales parentales deben excluirse del análisis de los resultados del ensayo. Si la mortalidad sigue una pauta de respuesta a la concentración, la mortalidad parental debe asignarse como efecto del producto problema y las réplicas no deben excluirse del análisis. Si el animal parental muere durante el ensayo de forma fortuita por un trato inadecuado o por accidente, o de forma inadvertida debido a un incidente inexplicado que no está relacionado con el efecto del producto problema, o resulta ser macho, la réplica correspondiente se excluye del análisis (véase el punto 51). El efecto tóxico del producto problema sobre el resultado reproductor se expresa como $EC_x$ ajustando los datos a un modelo adecuado mediante regresión no lineal para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en el resultado reproductor, o también el valor de la NOEC/LOEC (4). *Es preferible que las concentraciones de ensayo abarquen la más baja de las concentraciones con efecto utilizadas (por ejemplo, $EC_{10}$), lo que significa que este valor se calcula por interpolación y no por extrapolación.*

También hay que indicar la supervivencia de los animales parentales y el momento de la producción de la primera nidada. También pueden examinarse otros efectos, relacionados con el producto, sobre parámetros tales como el crecimiento (p. ej., la longitud) y, posiblemente, la tasa intrínseca de aumento de la población (véase el punto 44).

INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO PROBLEMA

Los resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véase el capítulo C.2 del presente anexo: Ensayo de inmovilización aguda de *Daphnia* sp.) realizado con *Daphnia magna* pueden ser útiles para seleccionar un intervalo adecuado de concentraciones de ensayo para los ensayos de reproducción. Hay que conocer la hidrosolubilidad y la presión de vapor del producto problema; también se debe disponer de un método analítico fiable para cuantificar el producto en las soluciones de ensayo con la eficiencia de recuperación y el límite de determinación establecidos.

Entre la información sobre el producto problema que puede ser útil para establecer las condiciones de ensayo se incluyen la fórmula estructural, la pureza del producto, la estabilidad a la luz, la estabilidad en las condiciones de ensayo, el $pK_a$, el $P_{ow}$ y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil [véanse los capítulos C.4 (determinación de la biodegradabilidad «fácil») y C.29 (biodegradabilidad fácil — $CO_2$ en recipientes sellados) del presente anexo].

VALIDEZ DEL ENSAYO

Para que el ensayo sea válido, los testigos deben cumplir los criterios de comportamiento siguientes:

— la mortalidad de los animales parentales (hembras de dafnia) no debe ser superior al 20 % al final del ensayo;

— el número medio de descendientes vivos producidos por cada animal parental superviviente al final del ensayo ha de ser $\geq 60$.

Nota: El mismo criterio de validez (20 %) puede utilizarse para la mortalidad de animales parentales de forma fortuita e inadvertida en los testigos, así como en cada una de las concentraciones de ensayo.

▼M7

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con las soluciones de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte. Los recipientes de ensayo serán normalmente vasos de vidrio.

Además, hará falta el siguiente equipo, en todo o en parte:

— aparato para medir el oxígeno (con microelectrodo o cualquier otro equipo que sea conveniente para medir el oxígeno disuelto en muestras de pequeño volumen);

— aparato adecuado para el control de la temperatura;

— pH-metro;

— aparato para determinar la dureza del agua;

— aparato para determinar la concentración de carbono orgánico total (COT) del agua o la demanda química de oxígeno (DQO);

— aparato adecuado para controlar el régimen de iluminación y medir la intensidad luminosa.

**Organismo de ensayo**

La especie que debe usarse en el ensayo es *Daphnia magna* Straus ([1]).

De preferencia, el clon debe estar identificado genotípicamente. Las investigaciones realizadas (1) han demostrado que el comportamiento reproductor del clon A (procedente del IRCHA de Francia) (5) cumple siempre el criterio de validez de una media de $\geq$ 60 descendientes vivos por animal parental que sobrevive cuando se cría en las condiciones descritas en este método de ensayo. No obstante, son aceptables otros clones, siempre que se demuestre que el cultivo de *Daphnia* cumple los criterios de validez del ensayo.

Al principio del ensayo, los animales tendrán una edad inferior a 24 horas y no deben ser progenie de primera nidada. Han de proceder de una población sana (es decir, sin signos de agresión, tales como mortalidad elevada, presencia de machos y efipios, retraso de la producción de la primera nidada, animales decolorados, etc.). Los animales de la población inicial deben mantenerse en condiciones de cultivo (luz, temperatura, medio, nutrición y número de animales por unidad de volumen) similares a las usadas en el ensayo. Cuando el medio de cultivo de dafnias que vaya a usarse en el ensayo sea distinto del usado en el cultivo habitual de dafnias, es recomendable prever un periodo de aclimatación anterior al ensayo, por lo general de unas 3 semanas de duración (es decir, una generación), para evitar agredir a los animales parentales.

**Medio de ensayo**

Es recomendable usar en este ensayo un medio definido completamente. Con ello se evita el uso de aditivos (tales como algas marinas o extracto de suelo) difíciles de caracterizar y se aumentan en consecuencia las oportunidades de normalización entre laboratorios. Se ha observado que los medios Elendt M4 (6) y M7 (véase el apéndice 2) son adecuados para este propósito. No obstante, son aceptables medios distintos [por ejemplo, (7) (8)], siempre que se demuestre que el comportamiento del cultivo de dafnias cumple los criterios de validez del ensayo.

([1]) Tal y como ocurre con cada relación empírica, debe verificarse que la sustancia problema está incluida en el ámbito de aplicabilidad de la relación.

▼M7

Si se usan medios con aditivos sin definir, estos deben especificarse con claridad, y en el informe del ensayo hay que aportar información sobre su composición, en particular el contenido en carbono, pues podría contribuir a la dieta suministrada. Es recomendable determinar en la preparación madre del aditivo orgánico el carbono orgánico total (COT), la demanda química de oxígeno (DQO) o las dos cosas, así como hacer una estimación de la contribución resultante al COT/DQO del medio de ensayo. Conviene también que los niveles de COT en el medio (es decir, antes de incorporar las algas) sean inferiores a 2 mg/l (9).

Si se ensayan productos que contengan metales, es importante tener en cuenta que las propiedades del medio de ensayo (por ejemplo, dureza, capacidad quelante) pueden afectar a la toxicidad del producto problema. Por ello es deseable usar un medio totalmente definido. Sin embargo, en este momento, los únicos medios totalmente definidos adecuados para el cultivo prolongado de *Daphnia magna* que se conocen son los Elendt M4 y M7. Ambos contienen el agente quelante EDTA. Se ha demostrado (2) que la «toxicidad aparente» del cadmio es generalmente inferior cuando el ensayo de reproducción se hace en medios M4 o M7 que cuando se hace en medios exentos de EDTA. Por tanto, M4 y M7 no son recomendables para ensayar productos con metales, y deben evitarse asimismo en estos casos otros medios que contengan agentes quelantes conocidos. En caso de productos que contengan metales, puede ser aconsejable usar otros medios como, por ejemplo, agua dulce dura reconstituida según ASTM (9), que no contiene EDTA. Esta combinación de agua dulce dura reconstituida según ASTM y extracto de algas marinas (10) es adecuada para el cultivo prolongado de *Daphnia magna* (2).

La concentración de oxígeno disuelto debe ser superior a 3 mg/l al comienzo y durante el ensayo. El pH debe estar comprendido entre 6 y 9, y normalmente no debe oscilar en más de 1,5 unidades en ninguno de los ensayos. Se recomienda utilizar una dureza superior a 140 mg/l (expresada como $CaCO_3$). Los ensayos realizados con valores iguales o superiores a este han demostrado un comportamiento reproductor que cumple los criterios de validez (11) (12).

**Soluciones de ensayo**

Las soluciones de ensayo de las concentraciones elegidas se preparan generalmente por dilución de una solución madre. Preferentemente, estas soluciones madre deben prepararse, si es posible sin utilizar disolventes ni dispersantes, por mezcla o agitación del producto problema en el medio de ensayo de forma mecánica, como, por ejemplo, con un agitador o ultrasonidos, u otros métodos adecuados. Es preferible exponer los sistemas de ensayo a las concentraciones del producto problema que se vayan a utilizar en el estudio, durante el tiempo que se requiera para demostrar el mantenimiento de unas concentraciones de exposición estables, antes de introducir los organismos de ensayo. Si el producto problema es difícil de disolver en agua, se deben seguir los procedimientos descritos en el documento de orientación de la OCDE sobre sustancias y mezclas difíciles (13). Debe evitarse el uso de disolventes o dispersantes, aunque en algunos casos puede ser necesario utilizarlos para obtener una solución madre con la concentración adecuada para la dosificación.

Además de las concentraciones de ensayo, debe utilizarse un testigo del agua de dilución con las réplicas adecuadas y, caso de resultar inevitable el uso de un disolvente, un testigo de este, también con sus réplicas adecuadas. Solo deben utilizarse en el ensayo disolventes o dispersantes de los que se hayan hecho estudios que demuestren que no afectan (o solo mínimamente) a la variable de respuesta. En (13) figuran ejemplos de disolventes (como la acetona, el etanol, el metanol, la dimetilformamida y el trietilenglicol) y dispersantes (como el Cremophor RH40, la metilcelulosa al 0,01 % y el HCO-40) adecuados. Si se utiliza

▼M7

un disolvente o dispersante, su concentración final no deberá exceder de 0,1 ml/l (13) y habrá de ser la misma en todos los recipientes de ensayo, excepto en el testigo del agua de dilución. No obstante, debe hacerse todo lo posible para mantener la concentración de disolvente al mínimo.

PROCEDIMIENTO

**Condiciones de exposición**

*Duración*

La duración del ensayo es de 21 días.

*Carga*

Los animales parentales se mantienen separados, uno por recipiente de ensayo, con un volumen de medio en cada recipiente de 50 a 100 ml (en el caso de *Daphnia magna*; es posible utilizar volúmenes menores con dáfnidos más pequeños, como *Ceriodaphnia dubia*), a menos que sea necesario un diseño dinámico para realizar el ensayo.

En ocasiones hay que emplear un volumen mayor a fin de satisfacer los requisitos del método analítico usado para determinar la concentración del producto problema, aunque también se permite poner en común las réplicas a efectos de este análisis. Si se usan volúmenes superiores a 100 ml, puede ser necesario aumentar la ración administrada a las dafnias para garantizar una disponibilidad suficiente de alimento y el cumplimiento de los criterios de validez.

*Animales de experimentación*

En ensayos semiestáticos, se mantienen por separado al menos 10 animales a cada concentración de ensayo y al menos 10 animales en la serie de testigo.

En ensayos dinámicos, se ha demostrado que es adecuado repartir 40 animales en 4 grupos de 10 a cada concentración de ensayo (1). Puede usarse un número inferior de organismos de ensayo, y se recomienda un mínimo de 20 animales por concentración repartidos en 2 o más réplicas de igual número de animales (por ejemplo, 4 réplicas con 5 dáfnidos cada una). Obsérvese que en los ensayos en los cuales se mantengan los animales en grupos, no será posible excluir ninguna descendencia de los análisis estadísticos si se da mortalidad parental fortuita o inadvertida cuando haya comenzado la reproducción y, por consiguiente, en estos casos el resultado reproductor debe expresarse como número total de descendientes vivos producidos por animal parental presente al principio del ensayo.

Hay que asignar los tratamientos a los recipientes de ensayo y realizar todas las manipulaciones posteriores de dichos recipientes de forma aleatoria. De otro modo podría introducirse un sesgo susceptible de ser interpretado como efecto de la concentración. En particular, si las unidades experimentales se manipulan en orden de tratamiento o de concentración, determinados efectos vinculados con el tiempo, como la fatiga u otros errores del operador, podrían ejercer un efecto más acusado a concentraciones más elevadas. Además, si es probable que los resultados se vean afectados por una condición inicial o ambiental del ensayo, como la posición en el laboratorio, habrá que pensar en la conveniencia de practicar agrupamientos.

*Alimentación*

En ensayos semiestáticos, la alimentación debe ser preferentemente diaria; en cualquier caso, tendrá una frecuencia mínima de 3 veces por semana (es decir, en correspondencia con los cambios de medio). Debe tenerse en cuenta la posible dilución de las concentraciones de exposición debida a la adición de los alimentos, y evitarla en la medida de lo posible utilizando suspensiones de algas concentradas. Deben documentarse las desviaciones con respecto a esta pauta (por ejemplo, ensayos dinámicos).

Durante el ensayo, la dieta de los animales parentales debe estar formada preferentemente por algas vivas de uno o varios de los siguientes tipos: *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes *Selenastrum capricornutum*) y *Desmodesmus subspicatus* (antes *Scenedesmus subspicatus*). La dieta suministrada se basará en la cantidad de carbono orgánico (C) proporcionada a cada animal parental. Las investigaciones realizadas (14) han demostrado que, en el caso de *Daphnia magna*, son suficientes raciones comprendidas entre 0,1 y 0,2 mg C/dafnia/día para alcanzar el número de descendientes vivos necesario a fin de cumplir los

▼M7

criterios de validez. La ración puede administrarse a una tasa constante durante todo el período de ensayo o, si se prefiere, a una tasa inferior al principio que se va incrementando en función del crecimiento de los animales parentales. No obstante, en este caso, las raciones deben permanecer en todo momento dentro del intervalo recomendado de 0,1 a 0,2 mg C/dafnia/día.

Si es preciso recurrir a parámetros indirectos, como el número de células de algas o la absorbancia luminosa, para determinar la ración adecuada (por razones de comodidad, pues medir el contenido de carbono requiere mucho tiempo), cada laboratorio debe crear su propio nomograma para la medición indirecta del contenido de carbono del cultivo de algas (véanse algunos consejos sobre construcción de nomogramas en el apéndice 3). Los nomogramas deben revisarse al menos una vez al año, y con mayor frecuencia si cambian las condiciones de los cultivos de algas. Se ha observado que la absorbancia luminosa proporciona una indicación del contenido de carbono mejor que el número de células (15).

Para reducir al mínimo el volumen de medio de cultivo de algas trasvasado a los recipientes de ensayo, la suspensión de algas administrada a las dafnias como alimento debe ser concentrada. Las algas pueden concentrarse mediante centrifugación seguida de resuspensión en medio de cultivo de dafnias.

*Iluminación*

Se aporta luz durante 16 horas a una intensidad no superior a 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, medida en la superficie del agua del recipiente. Con los instrumentos de medición de la luz calibrados en luxes, una gama equivalente de 1 000-1 500 lux con luz blanca fría corresponde aproximadamente a la intensidad luminosa recomendada de 15-20 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.)

*Temperatura*

La temperatura de los medios de ensayo debe encontrarse en el intervalo de 18-22 °C. No obstante, en un mismo ensayo, la temperatura no debe variar, a ser posible, más de 2 °C dentro de estos límites (por ejemplo, 18-20, 19-21 o 20-22 °C). Puede ser conveniente utilizar un recipiente de ensayo adicional con el fin de vigilar la temperatura.

*Aireación*

Los recipientes de ensayo no deben recibir aireación durante el ensayo.

**Diseño del ensayo**

*Ensayo de determinación del intervalo*

Cuando sea necesario, se llevará a cabo un ensayo de determinación del intervalo con, por ejemplo, cinco concentraciones del producto problema y dos réplicas de cada tratamiento y testigo. Para decidir sobre la gama de concentraciones que deba utilizarse en el ensayo de determinación del intervalo puede ser útil disponer de información adicional, procedente de ensayos con productos similares o de la bibliografía, sobre toxicidad aguda para *Daphnia* y/u otros organismos acuáticos.

La duración del experimento de determinación del intervalo será de 21 días, o suficiente para predecir de manera fiable los niveles con efecto. Al final del ensayo se evalúa la reproducción de las dafnias. Debe registrarse el número de animales parentales y la presencia de descendientes.

*Ensayo definitivo*

Normalmente se deben preparar al menos cinco concentraciones de ensayo que abarquen la concentración con efecto (p. ej., $EC_x$) y que formen una progresión geométrica con un factor de separación preferentemente no superior a 3,2. Debe utilizarse un número apropiado de réplicas con cada concentración de ensayo (véanse los puntos 24-25). Si se usan menos de cinco concentraciones, habrá que

▼M7

justificarlo. Los productos no deben someterse a ensayo a concentraciones superiores a su límite de solubilidad en el medio de ensayo. Antes de la realización del experimento, se recomienda considerar la potencia estadística del diseño de los ensayos utilizando métodos estadísticos apropiados (4). Al determinar el intervalo de concentraciones, debe tenerse en cuenta lo siguiente:

i) Si se estima el valor de $EC_x$ para los efectos sobre la reproducción, es aconsejable usar concentraciones suficientes para definir dicho valor con un nivel de confianza adecuado. Las concentraciones de ensayo utilizadas deben abarcar preferentemente la $EC_x$ estimada, de forma que este valor se obtenga por interpolación en lugar de extrapolación. Es una ventaja para el análisis estadístico siguiente tener más concentraciones de ensayo (por ejemplo, 10) y menos réplicas de cada concentración (por ejemplo, 5, con lo que se mantiene el número total de recipientes) y con 10 testigos.

ii) Si se estima la LOEC o la NOEC, la concentración de ensayo más baja debe ser tan baja que el resultado reproductor a esa concentración no sea significativamente inferior al del testigo. En caso contrario, será necesario repetir el ensayo a una concentración más baja reducida.

iii) Si se estima la LOEC o la NOEC, la concentración de ensayo más alta debe ser tan alta que el resultado reproductor a esa concentración sea significativamente inferior al del testigo. En caso contrario, será necesario repetir el ensayo a una concentración más alta aumentada, salvo que en el ensayo inicial se hubiera usado como concentración de ensayo más alta la concentración de ensayo máxima requerida a efectos de ensayo de los efectos crónicos (es decir, 10 mg/l).

Si no se observan efectos a la concentración más alta en el ensayo de determinación del intervalo (p. ej., a 10 mg/l), o cuando se considere muy probable que el producto problema sea de toxicidad baja o nula, debido a la falta de toxicidad para otros organismos o a una absorción baja o nula, el ensayo de reproducción podrá realizarse como un ensayo límite, utilizando una concentración de ensayo de, por ejemplo, 10 mg/l y el testigo. Deben utilizarse diez réplicas, tanto para los grupos de tratamiento como para los testigos. Cuando tenga que hacerse un ensayo límite en un sistema dinámico, puede ser adecuado un número menor de réplicas. Un ensayo límite ofrece la oportunidad de demostrar que no existe ningún efecto estadísticamente significativo a la concentración límite, pero si se registra algún efecto habrá que hacer en principio un ensayo completo.

**Testigos**

Además de la serie de ensayo, debe realizarse una serie de testigo con el medio de ensayo y, si procede, otra que contenga el disolvente o el dispersante. Cuando se utilice disolvente o dispersante, su concentración ha de ser igual a la usada en los recipientes que contienen el producto problema. Hay que emplear el número adecuado de réplicas (véanse los puntos 23-24).

Por lo general, en un ensayo bien ejecutado, el coeficiente de variación con respecto al número medio de descendientes vivos producidos por cada animal parental del testigo o testigos debe ser $\leq$ 25 %; este valor debe señalarse en caso de diseños de ensayo en los que se usen animales mantenidos por separado.

**Renovación del medio de ensayo**

La frecuencia de renovación del medio dependerá de la estabilidad del producto problema, pero debe ser al menos de tres veces por semana. Si de los ensayos de estabilidad preliminares (véase el punto 7) se deduce que la concentración del producto problema no es estable (es decir, si está fuera del intervalo comprendido entre el 80 y el 120 % del valor nominal o si cae por debajo del 80 % de la concentración inicial medida) a lo largo del período de renovación máximo (es decir, tres días), hay que considerar la renovación más frecuente del medio o la realización de un ensayo dinámico.

▼M7

Al renovar el medio en ensayos semiestáticos, se prepara una segunda serie de recipientes de ensayo y los animales parentales se transfieren a estos con ayuda, por ejemplo, de una pipeta de vidrio de diámetro adecuado. El volumen de medio transferido con las dafnias debe reducirse al mínimo.

**Observaciones**

Los resultados de las observaciones hechas durante el ensayo deben consignarse en fichas de datos (véanse ejemplos en los apéndices 4 y 5). Si hacen falta otras mediciones (véase el punto 44), puede ser necesario realizar más observaciones.

**Descendientes**

Preferiblemente, los descendientes producidos por cada animal parental se retirarán y contarán a diario desde la aparición de la primera nidada para evitar que consuman el alimento destinado a los padres. A los efectos de este método, solo es necesario contar el número de descendientes vivos, aunque debe registrarse la presencia de huevos abortados o de descendientes muertos.

**Mortalidad**

La mortalidad de los animales parentales se debe registrar preferiblemente a diario y al menos en las mismas ocasiones en que se cuenten los descendientes.

**Otros parámetros**

Aunque este método de ensayo se ha diseñado principalmente para evaluar los efectos sobre el resultado reproductor, quizá sea posible cuantificar otros efectos de forma suficiente para admitir el análisis estadístico. Se puede registrar el resultado reproductor por animal parental superviviente, es decir, el número de descendientes vivos producidos durante el ensayo por animal parental superviviente. Esto puede compararse con la variable de respuesta principal (resultado reproductor por animal parental al comienzo de la prueba que no haya muerto de forma fortuita o inadvertida durante el ensayo). Si se da mortalidad de animales parentales en réplicas expuestas, debe considerarse si la mortalidad sigue o no una pauta de respuesta a la concentración, por ejemplo si hay una regresión significativa de la respuesta frente a la concentración del producto problema con pendiente positiva (podría utilizarse para ello un método estadístico como la prueba de tendencia de Cochran-Armitage). Si la mortalidad no sigue una pauta de respuesta a la concentración, entonces esas réplicas con mortalidad de animales parentales deben excluirse del análisis de los resultados del ensayo. Si la mortalidad sigue una pauta de respuesta a la concentración, la mortalidad parental debe asignarse como efecto del producto problema y las réplicas no deben excluirse del análisis del resultado del ensayo. Las mediciones del crecimiento son muy interesantes, pues aportan información sobre posibles efectos subletales que pueden resultar útiles además de las medidas de la reproducción solas; es recomendable medir la longitud de los animales parentales (longitud del cuerpo sin contar la espina anal) al término del ensayo. Otras variables que pueden medirse o calcularse son el tiempo transcurrido hasta la producción de la primera nidada (y de las siguientes), el número y el tamaño de las nidadas por animal, el número de nidadas abortadas, la presencia de machos recién nacidos (OCDE, 2008) o efipios y, posiblemente, la tasa intrínseca de aumento de la población (véase el apéndice 1 para la definición y el apéndice 7 para la determinación del sexo de los recién nacidos).

**Frecuencia de las determinaciones analíticas y de las mediciones**

La concentración de oxígeno, la temperatura, la dureza y el pH deben medirse al menos una vez a la semana, en los medios fresco y viejo, en los testigos y a la concentración más alta del producto problema.

Durante el ensayo, las concentraciones del producto problema deben determinarse a intervalos regulares.

En los ensayos semiestáticos en los que se espere que la concentración del producto problema se mantenga dentro del ± 20 % de la concentración nominal (es decir, en el intervalo del 80-120 %, véanse los puntos 6, 7 y 39), se recomienda que las concentraciones de ensayo más alta y más baja se analicen recién preparadas y en el momento de su renovación al menos una vez durante la

▼M7

primera semana del ensayo (es decir, deben efectuarse análisis con una muestra de la misma solución, recién preparada y en el momento de su renovación). A partir de este momento, las determinaciones han de repetirse a intervalos al menos semanales.

En ensayos en los que no se espere que la concentración del producto problema se mantenga dentro del ± 20 % de la concentración nominal, es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo, recién preparadas y en el momento de su renovación. No obstante, en los ensayos en los que la concentración inicial medida del producto problema no esté dentro del ± 20 % de la concentración nominal, pero en los que puedan aportarse pruebas suficientes de que las concentraciones iniciales son repetibles y estables (es decir, que están dentro del intervalo del 80-120 % de la concentración inicial), las determinaciones del producto podrían limitarse en las semanas 2 y 3 del ensayo a las concentraciones más alta y más baja. En todos los casos, la determinación de las concentraciones de producto problema antes de la renovación solo debe realizarse en un recipiente replicado de cada concentración de ensayo.

Para los ensayos dinámicos es apropiado un régimen de muestreo similar al descrito para los semiestáticos (si bien en este caso no cabe hacer determinaciones de las soluciones «viejas»). Sin embargo, puede ser aconsejable aumentar el número de ocasiones de muestreo durante la primera semana (tres series de mediciones, por ejemplo) para garantizar que las concentraciones de ensayo permanezcan estables. En esta clase de ensayos, debe verificarse a diario el caudal del diluyente y del producto problema.

Si hay indicios de que la concentración de producto problema se ha mantenido satisfactoriamente a lo largo de todo el ensayo dentro del intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la medida inicialmente, los resultados pueden basarse en los valores nominales o medidos inicialmente. Si la desviación respecto a la concentración nominal o medida inicialmente es superior al ± 20 %, los resultados deben expresarse en términos de media ponderada en función del tiempo (véanse las orientaciones para el cálculo en el apéndice 6).

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

El objetivo del presente ensayo es determinar los efectos del producto problema sobre el resultado reproductor. El número total de descendientes vivos por animal parental debe calcularse por recipiente de ensayo (es decir, por cada réplica). Además, la reproducción puede calcularse sobre la base de la producción de descendientes vivos por organismo parental superviviente. Sin embargo, la variable de respuesta más pertinente desde el punto de vista medioambiental es el número total de descendientes vivos producidos por animal parental que no muere de forma fortuita ([1]) o inadvertida ([2]) durante el ensayo. Si el animal parental muere de forma fortuita o inadvertida durante el ensayo o resulta ser macho, la réplica correspondiente se excluye del análisis. Por tanto, este se basará en un número reducido de réplicas. Si se da mortalidad de animales parentales en réplicas expuestas, debe considerarse si la mortalidad sigue o no una pauta de respuesta a la concentración, por ejemplo si hay una regresión significativa de la respuesta frente a la concentración del producto problema con pendiente positiva (puede utilizarse para ello un método estadístico como la prueba de tendencia de Cochran-Armitage). Si la mortalidad no sigue una pauta de respuesta a la concentración, entonces esas réplicas con mortalidad de animales parentales deben excluirse del análisis de los resultados del ensayo. Si la mortalidad sigue una pauta de respuesta a la concentración, la mortalidad parental debe asignarse como efecto del producto problema y las réplicas no deben excluirse del análisis del resultado del ensayo.

En resumen, cuando la LOEC y la NOEC o la $EC_x$ se utilizan para expresar los efectos, se recomienda calcular los efectos sobre la reproducción utilizando las dos variables de respuesta mencionadas, es decir:

([1]) El peso de los peces al final de la fase de absorción puede estimarse a partir de los datos de estudios anteriores o del conocimiento del aumento probable de tamaño de la especie de ensayo a partir del peso típico al inicio del ensayo a lo lago de una duración típica de la absorción (por ejemplo, 28 días).

([2]) En la mayoría de programas que permiten realizar la regresión lineal, también se dan los errores típicos y el intervalo de confianza (IC) de las estimaciones como, por ejemplo, en Microsoft Excel utilizando el paquete de herramientas de análisis de datos.

▼M7

— como el número total de descendientes vivos producidos por animal parental que no muere de forma fortuita o inadvertida durante el ensayo y;

— como el número de descendientes vivos producidos por cada animal parental superviviente;

y después utilizar como resultado final el valor más bajo de LOEC y NOEC o $EC_x$ calculado utilizando cualquiera de estas dos variables de respuesta.

Antes de emplear los análisis estadísticos, p. ej. procedimientos de ANOVA, comparación de los grupos de tratamiento con el testigo mediante la prueba t de Stident, la prueba de Dunnett, la prueba de Williams, o la prueba de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra, se recomienda considerar la transformación de los datos cuando sea necesario para cumplir los requisitos de la prueba estadística de que se trate. Se pueden considerar como alternativas no paramétricas la prueba de Dunn o la de Mann-Whitney. Se calculan los intervalos de confianza del 95 % de las medias de los distintos grupos de tratamiento.

El número de animales parentales supervivientes en los testigos sin tratar es un criterio de validez, y debe documentarse y comunicarse. También deben consignarse en el informe final todos los demás efectos nocivos, por ejemplo el comportamiento anormal y las observaciones toxicológicas significativas.

*$EC_x$*

Los valores de $EC_x$, junto con sus correspondientes límites de confianza inferior y superior, se calculan utilizando métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, función logística o de Weibull, método de Spearman-Karber recortado o interpolación simple). Para calcular la EC10, la $EC_{50}$ o cualquier otra ECx, debe someterse a análisis de regresión el conjunto completo de datos.

*NOEC/LOEC*

Si el análisis estadístico se dirige a determinar la NOEC/LOEC, deben utilizarse métodos estadísticos adecuados de acuerdo con el documento 54 de la OCDE sobre enfoques actuales en el análisis estadístico de los datos de ecotoxicidad: guía de aplicación (4). En general, los efectos adversos del producto problema en comparación con el testigo se investigan utilizando contrastes de hipótesis unilaterales con $p \leq 0{,}05$.

La distribución normal y la homogeneidad de la varianza pueden probarse mediante un método estadístico adecuado, p. ej. la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente ($p \leq 0{,}05$). Puede realizarse ANOVA de un factor, seguido de pruebas de comparación múltiple. Las comparaciones múltiples (por ejemplo, prueba de Dunnett) o las pruebas de tendencia de ajuste secuencial (p. ej., prueba de Williams o prueba de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra) pueden utilizarse para calcular si existen diferencias significativas ($p \leq 0{,}05$) entre los testigos y las diversas concentraciones del producto problema [selección del ensayo recomendado de acuerdo con el documento de orientación 54 de la OCDE (4)]. De lo contrario, para determinar la LOEC y la NOEC pueden utilizarse métodos no paramétricos (p. ej., prueba U de Bonferroni según Holm o prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra).

*Ensayo límite*

Si se realiza un ensayo límite (comparación del testigo y de un solo un tratamiento) y se cumplen los requisitos previos de procedimientos de ensayos paramétricos (normalidad, homogeneidad), pueden evaluarse las respuestas métricas con la prueba de Student (prueba t). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse una prueba t de varianzas desiguales (como la prueba de Welch) o una prueba no paramétrica, como la prueba U de Mann-Whitney.

Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los testigos (testigo y testigo del disolvente o dispersante), las réplicas de cada testigo pueden someterse a ensayo según lo descrito para el ensayo límite. En caso de que tales ensayos no detecten diferencias significativas, pueden agruparse todas las réplicas de testigo y de testigo del disolvente. En caso contrario, todos los tratamientos deben compararse con el testigo del disolvente.

▼M7

**Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes,

— datos de identificación química, incluida la pureza.

*Especie de ensayo:*

— clon (si se ha tipificado genéticamente), proveedor u origen (si se conoce) y condiciones de cultivo aplicadas. Si se ha usado una especie distinta de *Daphnia magna*, debe consignarse y justificarse.

*Condiciones de ensayo:*

— procedimiento de ensayo utilizado (por ejemplo, semiestático o dinámico, volumen y carga expresada en número de dafnias por litro),

— fotoperíodo e intensidad luminosa,

— diseño del ensayo (por ejemplo, número de réplicas, número de animales parentales por réplica),

— detalles del medio de cultivo usado,

— si se usan, complementos de materia orgánica, con su composición, origen, método de preparación, COT/DQO de las preparaciones madre, estimación de los valores de COT/DQO obtenidos en el medio de ensayo,

— información detallada de la alimentación, con indicación de la cantidad (en mg C/dafnia/día) y el programa (tipo de alimento o alimentos, incluidos, si se trata de algas, del nombre específico (especie) y, si se conocen, la cepa y las condiciones de cultivo),

— método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (si se usa disolvente o dispersante, hay que indicarlo, junto con su concentración).

*Resultados:*

— resultados de los posibles estudios preliminares relativos a la estabilidad del producto problema,

— concentraciones de ensayo nominales y resultados de todos los análisis para determinar la concentración del producto problema en los recipientes de ensayo (véase un ejemplo de ficha de datos en el apéndice 5); también deben indicarse la eficiencia de recuperación del método y el límite de determinación,

— calidad del agua en los recipientes de ensayo (es decir, pH, temperatura y concentración de oxígeno disuelto, además de COT y DQO y dureza cuando proceda) (véase un ejemplo de ficha de datos en el apéndice 4),

— registro completo de la producción durante el ensayo de descendientes vivos de cada animal parental (véase un ejemplo de ficha de datos en el apéndice 4),

— número de muertes entre los animales parentales y día en que se hayan producido (véase un ejemplo de ficha de datos en el apéndice 4),

— coeficiente de variación del resultado reproductor de los testigos (basado en el número total de descendientes vivos por animal parental vivo al final del ensayo),

— representación gráfica del número total de descendientes vivos producidos por animal parental en cada réplica (con exclusión de los animales parentales que hayan podido morir de forma fortuita o inadvertida durante el ensayo) frente a la concentración del producto problema,

▼M7

— en su caso, representación gráfica del número total de descendientes vivos producidos por animal parental superviviente en cada réplica frente a la concentración del producto problema,

— en su caso, concentración mínima con efecto observado (LOEC) para la reproducción, acompañada de una descripción de los métodos estadísticos aplicados y de una indicación de la magnitud del efecto previsible que pueda detectarse (puede realizarse un análisis de potencia antes del comienzo del experimento con este fin), y concentración sin efecto observado (NOEC) para la reproducción, información sobre la variable de respuesta que se haya utilizado para calcular la LOEC y la NOEC (bien como número total de descendientes vivos por organismo materno que no haya muerto durante el ensayo de forma fortuita o inadvertida, o como número total de descendientes vivos por organismo materno superviviente), si procede, también deben indicarse los valores de LOEC y NOEC correspondientes a la mortalidad de los animales parentales,

— si procede, $EC_x$ para la reproducción e intervalos de confianza (p. ej., 90 % o 95 %), así como una representación gráfica del modelo ajustado usado para su cálculo, la pendiente de la curva respuesta-concentración y su error típico,

— otros efectos biológicos observados o medidos: indíquense todos los demás efectos biológicos observados o medidos (crecimiento de los animales parentales, por ejemplo) y la correspondiente justificación,

— explicación de cualquier desviación respecto al método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE, Test Guidelines Programme. Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, U.K., 20-21 March 1993.

(2) OCDE (1997). Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.6. OECD, Paris.

(3) OCDE (2008). Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna* reproduction test. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, No.88. OECD, Paris.

(4) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Number 54. OECD, Paris.

(5) Baird, D.J., *et al*. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. Ecotox. and Environ. Safety, 21, 257-265.

(6) Elendt, B.-P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

(7) EPA (2002). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Fifth Edition. EPA/821/R-02/012. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Washington, DC. www.epa.gov/waterscience/methods

(8) Vigano, L. (1991). Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 47, 775-782.

(9) ASTM. (2008) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. In: Annual Book of ASTM Standards; Water and Environmental Technology, vol. 11.04; ASTM E729 — 96 (2007) American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA

(10) Baird, D.J., *et al*. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In: Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988. (H. Løkke, H. Tyle and F. Bro-Rasmussen. Eds.) pp 144-148.

▼M7

(11) Parkhurst, B.R., J.L Forte. And G.P. and Wright (1981) Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna*. Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26: 1-8.

(12) Cowgill, U.M. and Milazzo, D.P. (1990). The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol., 120 (2): 185-196.

(13) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. OECD, Paris.

(14) Sims, I.R., S. Watson. and D. Holmes (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environ. Toxicol. and Chem., 12, 2053-2058.

(15) Sims, I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol., 128, 459-466.

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

A efectos del presente método de ensayo, se aplican las siguientes definiciones:

**Mortalidad fortuita**: mortalidad no relacionada con el producto, de causa accidental (es decir, causa conocida).

**Producto**: sustancia o mezcla.

**$EC_x$**: concentración del producto problema disuelto en agua que produce una reducción del x % en la reproducción de *Daphnia* dentro del período de exposición establecido.

**Mortalidad inadvertida**: mortalidad no relacionada con el producto, sin que se conozca su causa.

**Tasa intrínseca de aumento de la población**: medida del crecimiento de la población que integra el resultado reproductor y la mortalidad específica de la edad (1) (2) (3). En poblaciones en equilibrio estacionario es cero. En poblaciones en crecimiento es positiva, y negativa en las que disminuyen. Obviamente, toda tasa negativa es insostenible y en última instancia conduce a la extinción.

**Límite de detección**: concentración más baja que puede detectarse, aunque no cuantificarse.

**Límite de determinación**: concentración más baja que puede medirse cuantitativamente.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: concentración estudiada mínima a la que se observa que el producto ejerce un efecto estadísticamente significativo en la reproducción y en la mortalidad de los animales parentales (con $p < 0,05$) cuando se compara con el testigo, dentro de un tiempo de exposición dado. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

**Mortalidad**: un animal se considera muerto cuando está inmóvil, es decir, cuando es incapaz de nadar o cuando no se observa movimiento de los apéndices ni de la región posterior del abdomen en el plazo de 15 segundos desde una agitación suave del recipiente de ensayo (si se usa otra definición, debe indicarse junto con la referencia correspondiente).

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el testigo, no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro del periodo de exposición establecido.

**Descendientes**: ejemplares de dafnia jóvenes producidos por los animales parentales en el curso del ensayo.

**Animales parentales**: hembras de dafnia presentes al principio del ensayo y cuyo resultado reproductor constituye el objeto de estudio.

**Resultado reproductor**: número de descendientes vivos producidos por los animales parentales dentro del período de ensayo.

**Producto problema**: toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

1) Wilson, E.O. and Bossert, W.H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc. Publishers.

▼M7

2) Poole, R.W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. Mc Graw Hill Series in Population Biology, New York, p 532.

3) Meyer, J. S., Ingersoll, C. G., McDonald, L.L. and Boyce, M.S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, 1156-1166.

▼M7

*Apéndice 2*

## PREPARACIÓN DE MEDIOS ELENDT M7 Y M4 TOTALMENTE DEFINIDOS

### Aclimatación a los medios Elendt M7 y M4

Algunos laboratorios han tenido dificultades para transferir directamente las dafnias a los medios M4 (1) y M7. Sin embargo, se ha obtenido cierto éxito con una aclimatación gradual, esto es, cambiando del medio propio a Elendt al 30 %, luego al 60 % y por último al 100 %. El período de aclimatación necesario puede ser bastante largo, incluso de un mes.

### Preparación

*Oligoelementos*

Se empieza por preparar soluciones madre distintas (I) de cada oligoelemento en agua de pureza apropiada (desionizada, destilada o tratada mediante ósmosis inversa). A partir de estas soluciones madre (I) se prepara una segunda solución madre única (II) que contiene todos los oligoelementos (solución combinada), de la forma siguiente:

| Soluciones madre I (una sola sustancia) | Cantidad añadida al agua | Concentración (en relación con el medio M4) | Para preparar la solución madre II combinada, se añade al agua la siguiente cantidad de solución madre I | |
|---|---|---|---|---|
| | mg/l | | ml/l | |
| | | | M 4 | M 7 |
| $H_3BO_3$ | 57 190 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ | 7 210 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| LiCl | 6 120 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| RbCl | 1 420 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 3 040 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| NaBr | 320 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| Mo $Na_2O_4 \cdot 2\ H_2O$ | 1 260 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 335 | 20 000 veces | 1,0 | 0,25 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 200 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| KI | 65 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 20 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ | 5 000 | 2 000 veces | - | - |
| $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 1 991 | 2 000 veces | - | - |

Las soluciones de $Na_2EDTA$ y de $FeSO_4$ se preparan por separado, después se reúnen y se esterilizan en autoclave inmediatamente. Se obtiene así:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Solución de Fe-EDTA | | 1 000 veces | 20,0 | 5,0 |

▼**M7**

*Medios M4 y M7*

Los medios M4 y M7 se preparan a partir de la solución madre II con los macronutrientes y las vitaminas que siguen:

| | Cantidad añadida al agua | Concentración (en relación con el medio M4) | Cantidad de solución madre añadida para preparar el medio | |
|---|---|---|---|---|
| | mg/l | | ml/l | |
| | | | M 4 | M 7 |
| Solución madre II (combinación de oligoelementos) | | 20 veces | 50 | 50 |
| Soluciones madre de macronutrientes (una sola sustancia) | | | | |
| $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 293 800 | 1 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 246 600 | 2 000 veces | 0,5 | 0,5 |
| KCl | 58 000 | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1 000 veces | 1,0 | 1,0 |
| $Na_2SiO_3 \cdot 9\ H_2O$ | 50 000 | 5 000 veces | 0,2 | 0,2 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |
| Solución madre de vitaminas combinadas | - | 10 000 veces | 0,1 | 0,1 |

La solución madre de vitaminas combinadas se prepara añadiendo las 3 vitaminas a 1 litro de agua como se indica a continuación:

| | mg/l | | | |
|---|---|---|---|---|
| Clorhidrato de tiamina | 750 | 10 000 veces | | |
| Cianocobalamina (B12) | 10 | 10 000 veces | | |
| Biotina | 7,5 | 10 000 veces | | |

La solución madre de vitaminas combinadas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas. Las vitaminas se incorporan a los medios poco antes de usarlos.

*Nota:* Para evitar la precipitación de las sales al preparar los medios completos, se incorporan las partes alícuotas de las soluciones madre a aproximadamente 500-800 ml de agua desionizada y a continuación se completa hasta obtener 1 litro.

*Nota:* La primera publicación del medio M4 puede encontrarse en Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25-33.

▼M7

*Apéndice 3*

**ANÁLISIS DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT) Y ELABORACIÓN DE UN NOMOGRAMA DEL CONTENIDO EN COT DEL ALIMENTO DE ALGAS**

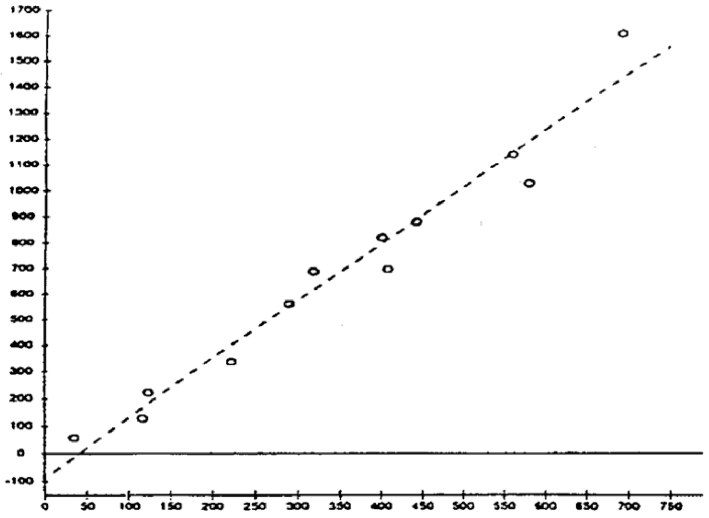
Es sabido que el contenido en carbono del alimento de algas no suele medirse directamente, sino por medio de correlaciones (es decir, de nomogramas) con medidas indirectas, como el número de células de algas o la absorbancia de luz.

El COT debe medirse por oxidación a alta temperatura y no con métodos de UV o de persulfato (véase más información en: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Para elaborar el nomograma, las algas se separan del medio de crecimiento por centrifugación seguida de resuspensión en agua destilada. Se mide la variable indirecta y la concentración de COT en cada una de las muestras por triplicado. Hay que analizar testigos con agua destilada únicamente y restar su concentración de COT de la observada en la muestra de algas.

El nomograma debe ser lineal a lo largo del intervalo necesario de concentraciones de carbono. A continuación se ilustran algunos ejemplos.

*Nota:* Estos nomogramas no deben usarse para hacer conversiones; es esencial que cada laboratorio prepare sus propios nomogramas.




*Chlorella vulgaris* var. *viridis* (CCAP 211/12).

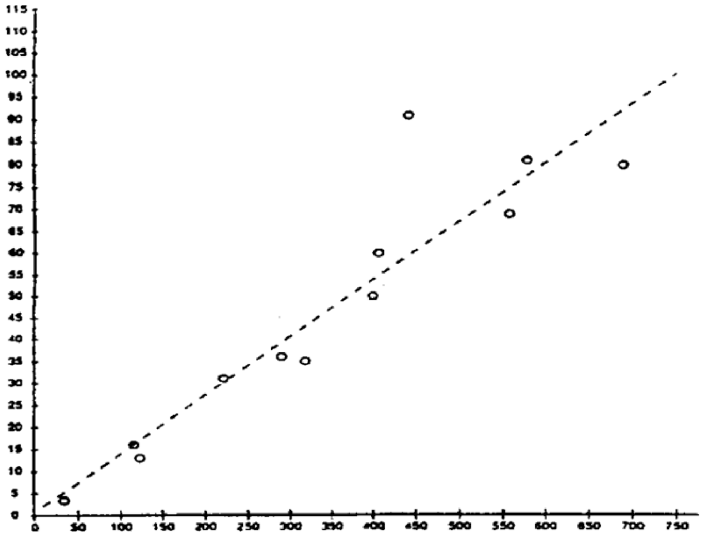
Regresión de mg/l de peso seco frente a mg C/1. Datos de suspensiones concentradas de células cultivadas en lotes semicontinuos, suspendidas de nuevo en agua destilada.

Eje de abscisas: mg C/1 de alimento concentrado de algas

Eje de ordenadas: mg/1 de peso seco del alimento concentrado de algas

Coeficiente corrector -0,980

▼**M7**



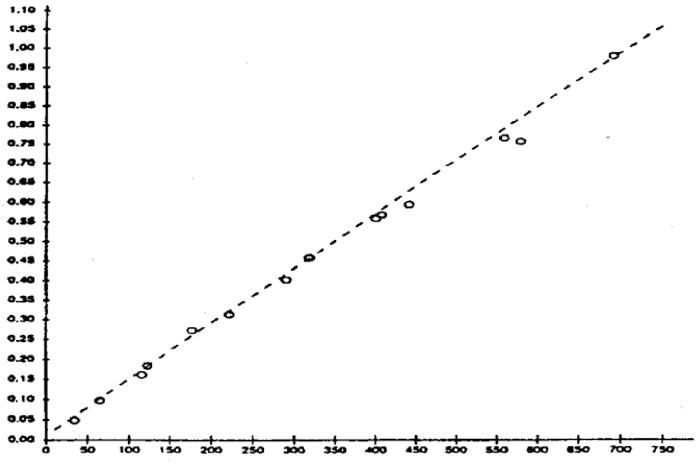
*Chlorella vulgaris* var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresión del número de células frente a mg C/1. Datos de suspensiones concentradas de células cultivadas en lotes semicontinuos, suspendidas de nuevo en agua destilada.

Eje de abscisas: mg C/1 de alimento concentrado de algas

Eje de ordenadas: N.º de células/1 de alimento concentrado de algas

Coeficiente corrector -0,926



*Chlorella vulgaris* var. *viridis* (CCAP 211/12).

Regresión de la absorbancia frente a mg C/1 (1 cm de camino óptico). Datos de suspensiones concentradas de células cultivadas en lotes semicontinuos, suspendidas de nuevo en agua destilada.

Eje de abscisas: mg C/1 de alimento concentrado de algas

Eje de ordenadas: absorbancia a 440 nm de una dilución al 1/10 de alimento concentrado de algas

Coeficiente corrector -0,998

▼M7

*Apéndice 4*

**EJEMPLO DE FICHA DE DATOS RELATIVOS A LA RENOVACIÓN DEL MEDIO, LA VIGILANCIA FISICOQUÍMICA, LA ALIMENTACIÓN, LA REPRODUCCIÓN Y LA MORTALIDAD DE ANIMALES PARENTALES DE DAFNIA**

| Experimento n.º: | Fecha de inicio: | | | | | | Clon: | | | Medio: | | | | Tipo de alimento: | | | | Producto problema: | | | | | Conc. nominal: | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Día | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | | |
| Renov. medio (marcar) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| pH (*) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | nuevo | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | viejo | |
| $O_2$ (mg/l) (*) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | nuevo | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | viejo | |
| Temp (°C) (*) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | nuevo | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | viejo | |
| Aporte alim. (marcar) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| N.º descendientes vivos (**) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total |
| Recipiente 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

▼M7

| Experimento n.º: | Fecha de inicio: | | | | | | Clon: | | | Medio: | | | | Tipo de alimento: | | | | Producto problema: | | | | | Conc. nominal: | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Día | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | | |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total | |
| Mortalidad acumulada de animales parentales (***) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

(*) Indíquese qué recipiente se ha utilizado para el experimento.
(**) Indíquense las nidadas abortadas como «AB» en la casilla pertinente.
(***) Indíquese la mortalidad de los animales parentales como «M» en la casilla pertinente.

▼**M7**

*Apéndice 5*

**EJEMPLO DE FICHA DE DATOS RELATIVOS A LOS RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS DEL PRODUCTO**

a) **Concentraciones medidas**

| Conc. nominal | Muestra semana 1 | | Muestra semana 2 | | Muestra semana 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fresca | Vieja | Fresca | Vieja | Fresca | Vieja |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

b) **Concentraciones medidas en porcentaje de la concentración nominal**

| Conc. nominal | Muestra semana 1 | | Muestra semana 2 | | Muestra semana 3 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Fresca | Vieja | Fresca | Vieja | Fresca | Vieja |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

▼M7

*Apéndice 6*

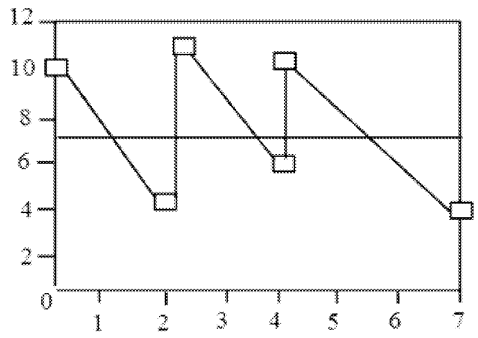
## CÁLCULO DE UNA MEDIA PONDERADA EN FUNCIÓN DEL TIEMPO

### Media ponderada en función del tiempo

Puesto que la concentración del producto problema puede disminuir a lo largo del tiempo comprendido entre las sucesivas renovaciones del medio, es preciso considerar cuál es la concentración que debe elegirse como representativa de la gama de concentraciones aplicadas a las dafnias parentales. La elección debe basarse en consideraciones biológicas y estadísticas. Si, por ejemplo, se piensa que la mayor influencia en la reproducción la ejerce la máxima concentración aplicada, debe usarse este valor máximo. En cambio, si se considera más importante el efecto acumulado o a plazo más largo del producto tóxico, será más relevante la concentración media. En este caso, una media apropiada será la concentración media ponderada en función del tiempo, pues tiene en cuenta la variación de la concentración instantánea a lo largo del tiempo.

*Figura 1*

**Ejemplo de media ponderada en función del tiempo**




La figura 1 ilustra un ejemplo de ensayo (simplificado) de 7 días de duración en el cual el medio se renueva los días 0, 2 y 4.

— La línea delgada en zigzag representa la concentración a lo largo del tiempo. Se supone que el descenso de la concentración sigue un proceso de descomposición exponencial.

— Los 6 puntos representados corresponden a las concentraciones medidas observadas al principio y al final de cada periodo de renovación.

— La línea gruesa indica la posición de la media ponderada en función del tiempo.

La media ponderada en función del tiempo se calcula de manera que el área situada bajo ella sea igual al área situada bajo la curva de concentración. El cálculo correspondiente al ejemplo anterior se ilustra en el cuadro 1.

*Cuadro 1*

**Cálculo de una media ponderada en función del tiempo**

| Renovación Número | Días | Conc 0 | Conc 1 | Ln (conc 0) | Ln (conc 1) | Superficie |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 10,000 | 4,493 | 2,303 | 1,503 | 13,767 |
| 2 | 2 | 11,000 | 6,037 | 2,398 | 1,798 | 16,544 |
| 3 | 3 | 10,000 | 4,066 | 2,303 | 1,403 | 19,781 |

▼**M7**

| Renovación Número | Días | Conc 0 | Conc 1 | Ln (conc 0) | Ln (conc 1) | Superficie |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Días totales: | 7 | | | | Superficie total: | 50,092 |
| | | | | | Media PT: | 7,156 |

*Días:* número de días del periodo de renovación.

*Conc 0:* concentración medida al principio de cada periodo de renovación.

*Conc 1:* concentración medida al final de cada periodo de renovación.

*Ln (conc 0):* logaritmo natural de conc 0.

*Ln (conc 1):* logaritmo natural de conc 1.

*Superficie:* área comprendida bajo la curva exponencial para cada periodo de renovación. Se calcula como sigue:

$$Superficie = \frac{Conc\ 0 - Conc\ 1}{Ln(Conc\ 0) - Ln(Conc\ 1)} \times días$$

La media ponderada en función del tiempo (Media PT) es igual a la superficie total dividida por los días totales.

Naturalmente, en el caso de un ensayo de reproducción de dafnias, el cuadro debe ampliarse para cubrir 21 días.

Es obvio que, si solo se hacen observaciones al principio y al final de cada periodo de renovación, será imposible confirmar que el proceso de descomposición sea, en efecto, exponencial. Una curva distinta daría lugar a un cálculo distinto de la superficie. En cualquier caso, la descomposición exponencial es una hipótesis plausible, y esta es probablemente la curva mejor a falta de más datos.

No obstante, es preciso hacer una advertencia para el caso de que el análisis del producto no logre detectar ningún producto al final del periodo de renovación. Salvo que se pueda estimar la velocidad a la que el producto desaparece de la solución, será imposible obtener un área bajo la curva realista y, por tanto, obtener una media ponderada en función del tiempo que sea razonable.

▼M7

*Apéndice 7*

**ORIENTACIONES PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL SEXO DE LOS RECIÉN NACIDOS**

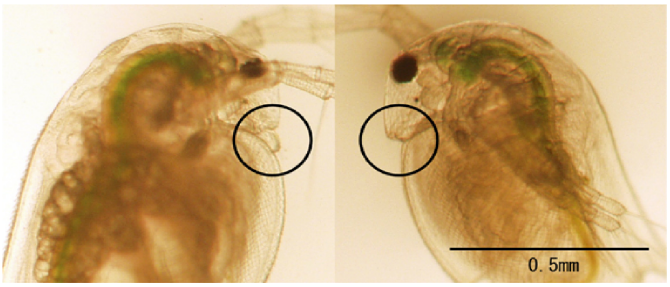
Puede darse producción de recién nacidos machos en condiciones ambientales cambiantes, tales como la reducción del fotoperiodo, la temperatura, la reducción de la concentración alimentaria, y el aumento de la densidad de población (Hobaek y Larson, 1990; Bauch *et al*., 1992). La producción de machos es también una respuesta conocida a ciertos reguladores del crecimiento de los insectos (Oda *et al*., 2005). En condiciones en que los productos agresores inducen una reducción de la descendencia reproductora de las hembras partenogenéticas, es de esperar un mayor número de machos (OCDE, 2008). Sobre la base de la información disponible, no es posible predecir qué será más sensible, si la proporción de machos y hembras o el parámetro de la reproducción; sin embargo, existen indicios («informe de validación» de referencia, parte 1) de que este aumento en el número de machos podría ser menos sensible que la disminución de descendencia. Puesto que la finalidad primaria del método de ensayo es evaluar el número de descendientes producidos, la aparición de machos es una observación opcional. Si este parámetro opcional se evalúa en un estudio, debe emplearse el criterio adicional de validez del ensayo de no más del 5 % de machos en los testigos.

La forma más práctica y fácil de distinguir el sexo de las dafnias es utilizar sus características fenotípicas, ya que los machos y las hembras son genéticamente idénticos, y su sexo es determinado por los factores ambientales. Los machos y las hembras difieren en la longitud y la morfología de las primeras antenas, que son más largas en los machos que en las hembras (fig. 1). Esta diferencia es reconocible justo después del nacimiento, aunque según crecen se van desarrollando otros caracteres sexuales secundarios (por ejemplo, véase la figura 2 de Olmstead y LeBlanc, 2000).

Para observar el sexo morfológico, los animales recién nacidos producidos por cada animal del ensayo deben transferirse con pipeta y colocarse en una placa de Petri con medio de ensayo. El medio se reduce a un mínimo para limitar el movimiento de los animales. La observación de las primeras antenas puede efectuarse en un microscopio estereoscópico ('10-60).

*Figura 1.*

**Macho (izquierda) y hembra (derecha) de 24 horas de vida de *D. magna*. Los machos se distinguen de las hembras por la longitud y la morfología de las primeras antenas, como se muestra en los círculos (Tatarazako *et al*., 2004).**




BIBLIOGRAFÍA

Hobaek A and Larson P. 1990. Sex determination in *Daphnia magna*. Ecology 71: 2255-2268.

Kleiven O.T., Larsson P., Hobaek A. 1992. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. Oikos 65, 197-206.

Oda S., Tatarazako N, Watanabe H., Morita M., and Iguchi T. 2005. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere 61:1168-1174.

▼**M7**

OCDE, 2008. Validation report for an enhancement of OECD TG 211 *Daphnia magna r*eproduction test. OECD Series on Testing and Assessment, Number 88. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development characteristics of *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry 19:2107-2113.

Tatarazako, N., Oda, S., Abe, R., Morita M. and Iguchi T., 2004. Development of a screening method for endocrine disruptors in crustaceans using *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea). Environmental Science 17, 439-449.

▼B

## C.21. MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL NITRÓGENO

### 1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 216 (2000).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

Este método de ensayo es un método de laboratorio destinado a investigar los efectos a largo plazo de productos químicos, tras una exposición única, en la transformación del nitrógeno por los microorganismos del suelo. El ensayo se basa principalmente en las recomendaciones de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (1). Sin embargo, se han tenido en cuenta otras directrices, como las del Biologische Bundesanstalt (2) de Alemania, la Environmental Protection Agency de los Estados Unidos (3) la Sociedad de Química y Toxicología Medioambientales *(Society of Environmental Toxicology and Chemistry,* SETAC) (4) y la Organización Internacional de Normalización (ISO) (5). En un taller de la OECD sobre selección de suelos/sedimentos, celebrado en Belgirate, Italia, en 1995 (6) se acordó el número y el tipo de suelos que deben usarse en este ensayo. Las recomendaciones sobre recogida, manejo y almacenamiento de muestras de suelo se basan en un documento orientativo de la ISO (7) y en las recomendaciones del taller de Belgirate. En la valoración y evaluación de las características de las sustancias de ensayo, puede resultar necesaria la determinación de los efectos de la actividad microbiana en el suelo, por ejemplo, cuando se requieran datos sobre los posibles efectos secundarios de los productos fitosanitarios en la microflora del suelo o cuando sea previsible la exposición de los microorganismos del suelo a los productos químicos distintos de los fitosanitarios. El ensayo de transformación del nitrógeno se lleva a cabo para determinar los efectos de estos productos químicos en la microflora del suelo. Si se ensayan productos agroquímicos (por ejemplo, productos fitosanitarios, abonos y productos químicos para la silvicultura), se llevarán a cabo tanto ensayos de transformación del nitrógeno como del carbono. Si se ensayan productos no agroquímicos, es suficiente el ensayo de transformación del nitrógeno. Sin embargo, si los valores $EC_{50}$ del ensayo de transformación del nitrógeno de estos productos químicos se sitúan dentro del intervalo encontrado para los inhibidores de la nitrificación disponibles en el comercio (por ejemplo, la nitrapirina), puede hacerse un ensayo de transformación del carbono para obtener más información.

Los suelos están formados por componentes vivos y no vivos que se dan en mezclas complejas y heterogéneas. Los microorganismos desempeñan un papel importante en la descomposición y transformación de la materia orgánica en los suelos fértiles. Existen muchas especies que contribuyen de diversas maneras a la fertilidad del suelo. Cualquier interferencia a largo plazo en estos procesos bioquímicos podría perturbar el ciclo de los nutrientes y alterar la fertilidad del suelo. La transformación del carbono y del nitrógeno se da en los suelos fértiles. Aunque las comunidades microbianas responsables de estos procesos difieren de unos suelos a otros, las vías de transformación son esencialmente las mismas.

Este método de ensayo está destinado a detectar los efectos negativos a largo plazo de una sustancia en el proceso de transformación del nitrógeno en los suelos aerobios de superficie. El método también permite calcular los efectos de una sustancia en la transformación del carbono por la microflora del suelo. La formación de nitratos se produce tras la degradación de los enlaces carbono-nitrógeno. Por tanto, si se encuentran índices iguales de producción de nitratos en suelos tratados y suelos de control, es muy probable que las principales rutas de degradación del carbono estén intactas y funcionales. El sustrato elegido para el ensayo (la harina de alfalfa) tiene una proporción carbono/nitrógeno favorable (normalmente entre 12/1 y 16/1). Por eso, la privación de carbono durante el ensayo es reducida y las comunidades microbianas, si resultan dañadas por una sustancia química, pueden recobrarse dentro de un plazo de 100 días.

▼B

Los ensayos a partir de los cuales se desarrolló este método estaban pensados principalmente para sustancias respecto a las cuales puede preverse la cantidad que llegará al suelo. Este es el caso, por ejemplo, de los productos fitosanitarios cuyo índice de aplicación al campo es conocido. Para los productos agroquímicos, es suficiente el ensayo de 2 dosis con arreglo al índice de aplicación estimado o previsto. Los productos agroquímicos pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados. Sin embargo, el ensayo no se limita a los productos agroquímicos. Cambiando tanto las cantidades de la sustancia de ensayo aplicada al suelo como la manera en que se evalúan los datos, el ensayo puede usarse también para productos químicos cuando se desconozca la cantidad de estos que llegará al suelo. De este modo, en el caso de los productos químicos distintos de los agrícolas, se determinan los efectos de una serie de concentraciones en la transformación del nitrógeno. A continuación, se utilizan los datos de estos ensayos para trazar una curva dosis-respuesta y calcular los valores $EC_X$, donde x es el porcentaje de efecto definido.

1.2. DEFINICIONES

**Transformación del nitrógeno:** es la degradación última por microorganismos de materia orgánica que contenga nitrógeno, mediante un proceso de amonificación y nitrificación, hasta llegar al nitrato inorgánico respectivo.

**$EC_X$ (concentración efectiva):** es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un porcentaje x de inhibición de la transformación de nitrógeno en nitrato.

**$EC_{50}$ (concentración efectiva mediana):** es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un 50 % de inhibición de la transformación de nitrógeno en nitrato.

1.3 COMPUESTOS DE REFERENCIA

Ninguno.

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Al suelo tamizado se le añade harina vegetal y, a continuación, se trata una parte con la sustancia de ensayo y se deja la otra sin tratar (control). Cuando se ensayen productos agroquímicos, se recomienda un mínimo de 2 concentraciones de ensayo, que deben elegirse en relación con la concentración más alta prevista para el campo. Después de 0,7, 14 y 28 días de incubación, se extraen muestras de suelos tratados y de control con un disolvente apropiado y se determinan las cantidades de nitrato en los extractos. El índice de formación de nitratos en las muestras tratadas se compara con el de las de control y se calcula el porcentaje de desviación de las muestras tratadas respecto a las de control. Todos los ensayos tendrán una duración mínima de 28 días. Si, al 28º día, la diferencia entre los suelos tratados y los no tratados es igual o superior al 25 %, se continuarán las mediciones hasta un máximo de 100 días. Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se añadirá a las muestras de suelo una serie de concentraciones de la sustancia de ensayo y se medirán al cabo de 28 días de incubación la cantidades de nitratos formadas en las muestras tratadas y de control. Los resultados de los ensayos con concentraciones múltiples se analizarán utilizando un modelo de regresión y se calcularán los valores $EC_X$ (es decir, $EC_{50}$, $EC_{25}$ y/o $EC_{10}$). Véanse las definiciones.

1.5. VALIDEZ DEL ENSAYO

Las evaluaciones de los resultados de los ensayos se basan en diferencias relativamente pequeñas (es decir, un valor medio de ± 25 %) entre concentraciones de nitratos en las muestras tratadas y de control, de modo que grandes variaciones en las muestras de control pueden dar lugar a resultados falsos. Por ello, la variación entre muestras de control en paralelo debe ser inferior al ± 15 %.

▼B

1.6. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1. **Equipo**

Se utilizarán recipientes de ensayo hechos de material químicamente inerte. Estos recipientes deben ser de capacidad adecuada de acuerdo con el procedimiento utilizado para la incubación de suelos, es decir, incubación en una muestra única o en una serie de muestras separadas (véase el punto 1.7.1.2). Hay que procurar reducir al mínimo la pérdida de agua y permitir el intercambio de gas durante el ensayo (por ejemplo, los recipientes pueden cubrirse con láminas de polietileno perforado). Cuando se ensayen sustancias volátiles, deben usarse recipientes sellables y herméticos cuyo tamaño sea tal que aproximadamente un cuarto de su volumen esté ocupado por la muestra de suelo.

Se utilizará equipo de laboratorio estándar, incluyendo:

— mecanismo de agitación: agitador mecánico o equipo equivalente,

— dispositivo de centrifugado (3 000 g) o filtrado (utilizando papel de filtro sin nitratos),

— instrumental de sensibilidad y reproductibilidad adecuadas para el análisis de nitratos.

1.6.2. **Selección y número de suelos**

Se utilizará un único suelo cuyas características recomendadas serán las siguientes:

— contenido de arena: entre el 50 % y el 75 %,

— pH: 5,5 - 7,5,

— contenido de carbono orgánico: 0,5 - 1,5 %

— debe medirse la masa microbiana (8) (9), cuyo contenido de carbono tiene que ser al menos el 1 % del total de carbono orgánico en el suelo.

En la mayoría de los casos, un suelo con estas características representa la situación más desfavorable, ya que la adsorción de la sustancia química de ensayo es mínima y su disponibilidad para la microflora es máxima. Por lo tanto, no son necesarios, por lo general, ensayos de otros suelos. Sin embargo, en algunas circunstancias, por ejemplo, cuando la sustancia de ensayo esté indicada principalmente para determinados suelos, como los suelos forestales ácidos, o en el caso de productos químicos cargados electrostáticamente, puede resultar necesario utilizar algún otro suelo.

▼B

1.6.3. **Recogida y almacenamiento de muestras de suelo**

1.6.3.1. *Recogida*

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del campo de donde se recoja la tierra para el ensayo. Se necesitan datos, entre otras cosas, de la localización exacta, la cubierta vegetal, fechas de tratamiento con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos orgánicos e inorgánicos, aplicación de sustancias biológicas o contaminación accidental. El lugar elegido para la recogida de suelo tiene que ser tal que permita un uso a largo plazo. Se consideran adecuados los pastos permanentes, los campos con cosechas anuales de cereales (excepto el maíz) o los abonos verdes sembrados densamente. El lugar donde se recojan las muestras no debe haberse tratado con productos fitosanitarios durante un mínimo de un año antes de la recogida de estas. Además, no debe haberse aplicado ningún abono orgánico durante al menos 6 meses. El uso de abonos minerales solo es aceptable cuando esté en concordancia con las necesidades del cultivo, en ese caso no deben tomarse muestras hasta transcurridos, al menos, 3 meses desde la aplicación del abono. Debe evitarse el uso de suelo tratado con abonos con efectos biocidas conocidos (por ejemplo, cianamida de calcio).

Hay que evitar la toma de muestras durante o inmediatamente después de períodos prolongados (de más de 30 días) de sequía o encharcamiento. En el caso de los suelos arados, deben tomarse muestras a una profundidad de 0 a 20 cm. Cuando se trate de pastizales u otros suelos que no se aren durante períodos más largos (al menos un ciclo de cultivo), la profundidad máxima del muestreo puede ser ligeramente superior a 20 cm (por ejemplo, 25 cm).

Las muestras de suelo deben transportarse en recipientes y en condiciones de temperatura que garanticen que las propiedades iniciales del suelo no se alteren significativamente.

1.6.3.2. *Almacenamiento*

Es preferible el uso de muestras de suelo recién recogidas. Si no se puede evitar el almacenamiento en el laboratorio, las muestras de suelo pueden guardarse en la oscuridad a 4 ± 2 $^{o}$C durante un máximo de 3 meses. Durante el almacenamiento, debe asegurarse el mantenimiento de condiciones aerobias. Si se recogen muestras de suelo de zonas que estén congeladas durante, al menos, tres meses al año, puede considerarse la posibilidad de almacenarlas durante 6 meses a entre - 18 $^{o}$C y - 22 $^{o}$C. Se medirá la biomasa microbiana de las muestras almacenadas antes de cada experimento. La cantidad de carbono en la biomasa debe ser como mínimo el 1 % del total de carbono orgánico de la muestra de suelo (véase el punto 1.6.2).

1.6.4. **Manejo y preparación del suelo para el ensayo**

1.6.4.1. *Preincubación*

Cuando las muestras de suelo hayan estado almacenadas (véase el punto 1.6.3.2), se recomienda preincubar durante un período de entre 2 y 28 días. La temperatura y la humedad del suelo durante la preincubación deben ser semejantes a las que se den durante el ensayo (véanse los puntos 1.6.4.2 y 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Características fisicoquímicas*

Se separarán manualmente los objetos grandes (por ejemplo, piedras, trozos de plantas, etc.) de la muestra de suelo y, a continuación, se tamizará la muestra por vía húmeda sin secar en exceso para obtener un tamaño de las partículas no superior a 2 mm. Deberá ajustarse el contenido de humedad de la muestra con agua destilada o desionizada para llegar a un valor entre el 40 % y el 60 % de la capacidad máxima de retención de agua.

1.6.4.3. *Adición de sustrato orgánico*

La muestra de suelo debe mezclarse con un sustrato orgánico adecuado, por ejemplo, harina de alfalfa-hierba-forraje verde (principal componente: *Medicago sativa)* con una proporción C/N entre 1271 y 16/1. La proporción alfalfa-muestra de suelo recomendada es 5 g de alfalfa por kilo de muestra (peso en seco).

1.6.5. **Preparación de la sustancia de ensayo para la aplicación al suelo**

La sustancia de ensayo se aplica normalmente utilizando un vehículo. El vehículo puede ser agua (para las sustancias solubles en el agua) o un sólido inerte como arena fina de cuarzo (tamaño de las partículas: 0,1 - 0,5 mm). Deben evitarse los vehículos líquidos distintos del agua (por ejemplo, disolventes orgánicos como la acetona o el cloroformo) porque pueden dañar la microflora. Si se usa arena como vehículo, puede recubrirse con la sustancia de ensayo disuelta o suspendida en un disolvente apropiado. En tal caso, debe eliminarse el disolvente por evaporación antes de mezclarse con la muestra de suelo. Para una distribución óptima de la sustancia de ensayo en el suelo, se recomienda una proporción de 10 g de arena por kilo de suelo (peso en seco). Las muestras de control se tratarán solo con una cantidad equivalente de agua y/o arena de cuarzo.

Cuando se ensayen sustancias químicas volátiles, deben evitarse pérdidas durante el tratamiento en la medida de lo posible y habrá que procurar conseguir una distribución homogénea en la muestra de suelo (por ejemplo, deberá inyectarse la sustancia de ensayo en la muestra en varios sitios).

1.6.6. **Concentraciones de ensayo**

Cuando se ensayen productos agroquímicos, deberán utilizarse al menos 2 concentraciones. La concentración más baja debe corresponder, al menos, a la cantidad máxima que se prevé que llegue al suelo en la práctica mientras la concentración más alta tiene que ser un múltiplo de la concentración más baja. Las concentraciones de la sustancia de ensayo añadida al suelo se calcula suponiendo una incorporación uniforme a una profundidad de 5 cm y una densidad aparente del suelo de 1,5. Para los productos agroquímicos que se aplican directamente al suelo o para las sustancias químicas para las cuales puede calcularse la cantidad que llega al suelo, las concentraciones de ensayo recomendadas son la máxima concentración ambiental prevista [Predicted Environmental Concentration (PEC)]. Las sustancias destinadas a ser aplicadas a los suelos varias veces a lo largo de un ciclo tiene que ensayarse a concentraciones resultantes de multiplicar la PEC por el número máximo de aplicaciones previsto. Sin embargo, la concentración superior ensayada no debe superar 10 veces el índice máximo para una aplicación. Si se ensayan productos químicos no agrícolas, se empleará una serie geométrica de, al menos, 5 concentraciones. Las concentraciones ensayadas han de cubrir el intervalo necesario para determinar los valores $EC_X$.

▼B

1.7. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.7.1. **Condiciones de exposición**

1.7.1.1. *Tratamiento y control*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en 3 partes de igual peso. Dos partes se mezclarán con el vehículo que contenga el producto y la otra, con el vehículo sin el producto (control). Se recomienda un mínimo de 3 copias para ambos tipos de muestras, las tratadas y las no tratadas. Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, la muestra de suelo se dividirá en 6 partes de igual peso. 5 de las muestras se mezclarán con el vehículo que contenga la sustancia de ensayo y la sexta, con el vehículo sin la sustancia. Se recomienda preparar 3 copias tanto para las muestras tratadas como para las de control. Debe procurarse una distribución homogénea de la sustancia de ensayo en las muestras tratadas. Durante la mezcla, se evitará la compactación de la muestra o la formación de grumos.

1.7.1.2. *Incubación de las muestras de suelo*

La incubación de las muestras de suelo puede hacerse de dos maneras: como dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, o como una serie de submuestras separadas de igual tamaño de suelo tratado, por una parte, y de suelo no tratado, por otra. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, el ensayo solo debe hacerse con una serie de submuestras separadas. Cuando las muestras de suelo se incuben en una muestra única, se prepararán grandes cantidades de suelo tratado y no tratado, y se tomarán las submuestras que deban analizarse según se necesite a lo largo del ensayo. La cantidad preparada inicialmente para las muestras tratadas y para las de control dependerá del tamaño de las submuestras, el número de ejemplares utilizados para el análisis y el número máximo previsto de períodos de muestreo. Las muestras de suelo incubadas como muestra única deben mezclarse bien antes de preparar submuestras. Cuando la incubación se haga en una serie de muestras separadas, las dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, se dividirán en el número de submuestras requerido, y estas se utilizarán según se necesite. En los experimentos en los que puedan preverse más de dos tiempos de muestreo, habrán de prepararse las submuestras suficientes, teniendo en cuenta los ejemplares y los tiempos de muestreo. Deberán incubarse, al menos, 3 copias de las muestras de ensayo en condiciones aerobias (véase el punto 1.7.1.1). Durante todos los ensayos, se utilizarán recipientes adecuados con suficiente espacio libre para evitar la aparición de condiciones anaerobias. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, el ensayo solo debe hacerse con una serie de submuestras separadas.

1.7.1.3. *Condiciones y duración del ensayo*

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura de 20 ± 2 $^{o}$C. La humedad de las muestras se mantendrá durante el ensayo entre el 40 % y el 60 % de la capacidad máxima de retención de agua del suelo (véase el punto 1.6.4.2) con una variación máxima del ±5 %. Podrá añadirse agua destilada y desionizada según se necesite.

La duración mínima del ensayo es de 28 días. Cuando se ensayen productos agroquímicos, se compararán los índices de formación de nitrato en las muestras tratadas y de control. Si estos índices difieren en más del 25 % al 28$^{o}$ día, se continuará el ensayo hasta que se obtenga una diferencia igual o menor al 25 % o bien durante un máximo de 100 días. En el caso de los productos químicos no agrícolas, se pondrá fin al ensayo a los 28 días. Al 28$^{o}$ día, se determinarán las cantidades de nitratos en las muestras tratadas y de control y se calcularán los valores $EC_X$.

▼B

1.7.2. **Toma de muestras y análisis de suelos**

1.7.2.1. *Calendario de toma de muestras*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, se hará el análisis de nitratos en las muestras de suelo los días 0, 7, 14 y 28. Cuando se necesite un ensayo prolongado, se harán nuevas mediciones a intervalos de 14 de días a partir del 28o día.

Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se utilizarán como mínimo 5 concentraciones de ensayo y se hará el análisis de nitratos en las muestras de suelo al principio (día 0) y al final del período de exposición (28 días). Si se considera necesario, puede añadirse una medición intermedia, por ejemplo, al séptimo día. Los datos obtenidos al 28º día se utilizarán para hallar el valor $EC_x$ de la sustancia química. Si se desea, pueden utilizarse los datos de las muestras de control obtenidos el día 0 para indicar la cantidad inicial de nitratos en el suelo.

1.7.2.2. *Análisis de las muestras de suelo*

La cantidad de nitratos formada en cada ejemplar de muestra tratado y de control se determinará en cada tiempo de muestreo. Los nitratos se extraerán de la muestra de suelo agitándola con un disolvente de extracción adecuado, por ejemplo, una solución 0,1 M de cloruro de potasio. Se recomienda una proporción de 5 ml de KCl por gramo equivalente de suelo en peso seco. Para optimizar la extracción, los recipientes que contengan la muestra de suelo y la solución de extracción no deberán llenarse más de la mitad. Las mezclas se agitarán a 150 rpm durante 60 minutos. A continuación, se centrifugarán o filtrarán y se analizará la fase líquida para hallar los nitratos. Los extractos líquidos sin partículas pueden almacenarse antes del análisis a menos 20 ± 5 ºC hasta 6 meses.

2. **RESULTADOS**

2.1. TRATAMIENTO DE RESULTADOS

Si se hacen ensayos con productos agroquímicos, deberán registrarse las cantidades de nitratos formadas en cada copia de muestra de suelo y darse en forma de tabla los valores medios de todos los ejemplares. Se evaluarán los índices de transformación del nitrógeno mediante métodos estadísticos apropiados y generalmente aceptables (por ejemplo, test-F, nivel de significación del 5 %). Las cantidades de nitrato formadas se expresarán en mg de nitrato/kg de muestra (peso seco)/día. La tasa de formación de nitrato en cada tratamiento se comparará con el de la muestra de control y se calculará el porcentaje de desviación respecto a esta.

Cuando se ensayen productos químicos no agrícolas, se determinará la cantidad de nitratos formada en cada copia y se trazará una curva dosis-respuesta para el cálculo de los valores $EC_x$. Las cantidades de nitratos (es decir, mg de nitratos/kg de muestra en peso seco) halladas en las muestras tratadas a los 28 días se compararán con las halladas en las muestras de control. A partir de estos datos, se calculará los valores porcentuales de inhibición para cada concentración de ensayo. Estos porcentajes se representarán en un gráfico en función de la concentración y, a continuación, se utilizarán procedimientos estadísticos para calcular los valores $EC_X$. Los límites de confianza ($p = 0,95$) para el valor $EC_X$ calculado se hallarán también utilizando procedimientos estándar (10) (11) (12).

Las sustancias de ensayo que contengan grandes cantidades de nitrógeno pueden contribuir a las cantidades de nitratos formados durante el ensayo. Si estas sustancias se ensayan a concentraciones altas (por ejemplo, sustancias químicas que esté previsto utilizar en aplicaciones repetidas), deben incluirse en el ensayo muestras de control apropiadas (es decir, muestra de suelo más sustancia de ensayo, pero sin harina vegetal). Los datos de estas muestras de control deben tenerse en cuenta en los cálculos de la $EC_X$.

▼B

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cuando se evalúen los resultados de los ensayos con productos agroquímicos y la diferencia en los índices de formación de nitratos entre el tratamiento más bajo (es decir, la concentración máxima prevista) y la muestra de control no supere el 25 % en cualquier tiempo de muestreo a partir del 28º día, el producto podrá considerarse que no tiene influencia a largo plazo en la transformación de nitrógeno en el suelo. Cuando se evalúen los resultados de ensayos con sustancias químicas no agrícolas, se utilizarán los valores $EC_{50}$, $EC_{25}$ y/o $EC_{10}$.

3. **INFORME**

El informe del ensayo debe incluir los datos siguientes:

Identificación completa del suelo utilizado, incluyendo:

— referencia geográfica del lugar (latitud y longitud),

— información sobre la historia del lugar (es decir, cubierta vegetal, tratamientos con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos, contaminación accidental, etc.),

— tipo de uso (por ejemplo, suelo agrícola, bosque, etc.),

— profundidad de muestreo (cm),

— contenido de arena/limo/arcilla (% peso seco),

— pH (en agua),

— contenido de carbono orgánico (% peso seco),

— contenido de nitrógeno (% peso seco),

— concentración inicial de nitratos (mg nitratos/kg peso seco),

— capacidad de intercambio de cationes (mmol/kg),

— biomasa microbiana en porcentaje del carbono orgánico total,

— referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro,

— toda la información sobre la recogida y almacenamiento de las muestras de suelo,

— datos de la preincubación del suelo, si procede.

Sustancia de ensayo:

— naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas,

— identificación química, en su caso, incluyendo fórmula estructural, pureza (es decir, en el caso de los productos fitosanitarios, el porcentaje de principio activo) y contenido de nitrógeno.

Sustrato:

— origen del sustrato,

— composición (es decir, harina de alfalfa, harina de alfalfa-hierba-forraje verde),

— contenido de carbono y nitrógeno (% peso seco),

— tamaño del tamiz (mm).

▼B

Condiciones de ensayo:

— información sobre la adición al suelo del sustrato orgánico,

— número de concentraciones de la sustancia de ensayo utilizada y, en su caso, justificación de las concentraciones seleccionadas,

— datos de la aplicación de la sustancia de ensayo al suelo,

— temperatura de incubación,

— contenido de humedad al principio y durante el ensayo,

— método de incubación del suelo utilizado (es decir, en una muestra única o en una serie de submuestras separadas),

— número de ejemplares,

— tiempos de muestreo,

— método utilizado para la extracción de nitratos del suelo.

Resultados:

— procedimiento analítico y equipo empleado para analizar los nitratos,

— tabla de resultados incluyendo los distintos valores de las mediciones de nitratos y los valores medios,

— variación entre los ejemplares de las muestras tratadas y la muestras de control,

— explicación de las correcciones efectuadas en los cálculos, si procede,

— variación porcentual de los índices de formación de nitratos en cada tiempo de muestreo o, si procede, el valor $EC_{50}$ con un límite de confianza del 95 %, otros valores $EC_x$ (es decir, $EC_{25}$ o $EC_{10}$) con intervalos de confianza, y una gráfica de la curva dosis-respuesta,

— tratamiento estadístico de los resultados,

— cualquier información u observación complementaria importante para interpretar los resultados.

4. **REFERENCIAS**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality — Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: *Soil Quality -Biological Methods.*

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., 96, 99-113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

## C.22. MICROORGANISMOS DEL SUELO: ENSAYO DE TRANSFORMACIÓN DEL CARBONO

### 1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 217 (2000).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

En el presente método de ensayo se describe un método de laboratorio diseñado para investigar los efectos potenciales a largo plazo de una exposición única a productos fitosanitarios y posiblemente otras sustancias químicas sobre la actividad de transformación del carbono por los microorganismos del suelo. El ensayo se basa principalmente en las recomendaciones de la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de las Plantas (1). Sin embargo, se han tenido en cuenta otras directrices, como las del Biologische Bundesanstalt (2) de Alemania, la Environmental Protection Agency de Estados Unidos (3) y la SETAC (4). En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (5) se alcanzó un acuerdo sobre el número y tipos de suelos que deben utilizarse en estos ensayos. Las recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de suelo se basan en un documento orientativo de la ISO (6) y en las recomendaciones del seminario de Belgirate.

En la valoración y evaluación de las características de las sustancias de ensayo, puede resultar necesaria la determinación de los efectos de la actividad microbiana en el suelo, por ejemplo, cuando se requieran datos sobre los posibles efectos secundarios de los productos fitosanitarios en la microflora del suelo o cuando sea previsible la exposición de los microorganismos del suelo a productos químicos distintos de los fitosanitarios. El ensayo de transformación del carbono se lleva a cabo para determinar los efectos de estos productos químicos en la microflora del suelo. Si se ensayan productos agroquímicos (por ejemplo, productos fitosanitarios, abonos y productos químicos para la silvicultura), se llevarán a cabo tanto ensayos de transformación del carbono como del nitrógeno. Si se trata de productos no agroquímicos, es suficiente el ensayo de transformación del nitrógeno. Sin embargo, si los valores $EC_{50}$ del ensayo de transformación del nitrógeno de estos productos químicos se sitúan dentro del intervalo encontrado para los inhibidores de la nitrificación disponibles en el comercio (por ejemplo, la nitrapirina), puede hacerse un ensayo de transformación del carbono para obtener más información.

Los suelos están formados por componentes vivos y no vivos que se dan en mezclas complejas y heterogéneas. Los microorganismos desempeñan un papel importante en la descomposición y transformación de la materia orgánica en los suelos fértiles. Existen muchas especies que contribuyen de diversas maneras a la fertilidad del suelo. Cualquier interferencia a largo plazo en estos procesos bioquímicos podría perturbar el ciclo de los nutrientes y alterar la fertilidad del suelo. La transformación del carbono y del nitrógeno se da en todos los suelos fértiles. Aunque las comunidades microbianas responsables de estos procesos difieren de unos suelos a otros, las rutas de transformación son esencialmente las mismas.

▼B

Este método de ensayo está pensado para detectar los efectos negativos a largo plazo de una sustancia en el proceso de transformación del carbono en los suelos aerobios de superficie. El ensayo es sensible a alteraciones de la envergadura y la actividad de las comunidades microbianas responsables de la transformación del carbono, al someterlas a estrés químico y privación de carbono. Se utiliza un suelo arenoso con bajo contenido de materia orgánica. Se trata este suelo con la sustancia de ensayo y se incuba en condiciones que permitan un rápido metabolismo microbiano. En estas condiciones, las fuentes de carbono de fácil obtención se agotan rápidamente en el suelo. Este hecho ocasiona una privación de carbono que causa la muerte de las células microbianas e induce el letargo y/o la esporulación. Si el ensayo se prolonga durante más de 28 días, puede medirse la suma de estas reacciones en controles (de suelo no tratado) como pérdida progresiva de biomasa microbiana metabólicamente activa (7). Si la biomasa del suelo sometido a estrés de carbono, en las condiciones del ensayo, se ve afectada por la presencia de un producto químico, puede que no regrese al mismo nivel que el control. Por ello, las perturbaciones causadas por la sustancia de ensayo en cualquier momento de la realización de este persistirán frecuentemente hasta su finalización.

Los ensayos a partir de los cuales se desarrolló este método estaban pensados principalmente para sustancias respecto a las cuales puede preverse la cantidad que llegará al suelo. Este es el caso, por ejemplo, de los productos fitosanitarios, cuyo índice de aplicación en el campo es conocido. Para los productos agroquímicos, es suficiente el ensayo de dos dosis con arreglo al índice de aplicación estimado o previsto. Los productos agroquímicos pueden someterse a ensayo en forma de principios activos (p.a.) o de productos formulados. Sin embargo, el ensayo no se limita a los productos químicos con concentraciones en el medio ambiente previsibles. Cambiando tanto las cantidades de la sustancia de ensayo aplicada al suelo como la manera en que se evalúan los datos, el ensayo puede usarse también para productos químicos de los cuales se desconozca la cantidad que llegará al suelo. De este modo, en el caso de los productos no agroquímicos, se determinan los efectos de una serie de concentraciones en la transformación del carbono. A continuación, se utilizan los datos de estos ensayos para trazar una curva dosis-respuesta y calcular los valores EC, donde x es el porcentaje de efecto definido.

1.2 DEFINICIONES

**Transformación del carbono:** es la degradación por microorganismos de la materia orgánica hasta formar dióxido de carbono como producto final.

**$EC_X$ (concentración efectiva):** es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un porcentaje x de inhibición de la transformación del carbono en dióxido de carbono.

**$EC_{50}$ (concentración efectiva mediana):** es la concentración de la sustancia de ensayo en el suelo que da lugar a un 50 % de inhibición de la transformación del carbono en dióxido de carbono.

1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Ninguna.

▼B

1.4 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se trata parte del suelo tamizado con la sustancia de ensayo y se deja otra sin tratar (control). Cuando se ensayen productos agroquímicos, se recomienda un mínimo de dos concentraciones de ensayo, que deberán elegirse en relación con la concentración más alta prevista sobre el terreno. Después de 0, 7, 14 y 28 días de incubación, se mezclarán muestras de suelos tratados y de control con glucosa y se medirán las tasas de respiración inducidas por la glucosa durante 12 horas consecutivas. Las tasas de respiración se expresan como dióxido de carbono liberado (mg dióxido de carbono/kg suelo seco/h) u oxígeno consumido (mg oxígeno/kg suelo/h). Se comparará la tasa de respiración en las muestras de suelo tratado con la de control y se calculará el porcentaje de desviación respecto a esta. Todos los ensayos tendrán una duración mínima de 28 días. Si, al 28º día, la diferencia entre los suelos tratados y los no tratados es igual o superior al 25 %, se continuarán las mediciones a intervalos de 14 días hasta un máximo de 100 días. Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se añadirá a las muestras de suelo una serie de concentraciones de la sustancia de ensayo y se medirán al cabo de 28 días las tasas de respiración inducidas por glucosa (es decir, la media de las cantidades de dióxido de carbono formado u oxígeno consumido). Se analizarán los resultados de los ensayos con una serie de concentraciones utilizando un modelo de regresión y se calcularán los valores $EC_X$ (es decir, $EC_{50}$, $EC_{25}$ y/o $EC_{10}$). Véanse las definiciones.

1.5 VALIDEZ DEL ENSAYO

Las evaluaciones de los resultados de los ensayos con productos agroquímicos se basan en diferencias relativamente pequeñas (de un valor medio de ± 25 %) entre el dióxido de carbono liberado o el oxígeno consumido en (o por) las muestras de suelo tratado y de control, por lo que grandes variaciones en las muestras de control pueden dar lugar a resultados falsos. Por este motivo, la variación entre muestras de control en paralelo deberá ser inferior al ± 15 %.

1.6 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.6.1 **Equipo**

Se utilizarán recipientes de ensayo hechos de material químicamente inerte. Estos recipientes deberán ser de capacidad adecuada de acuerdo con el procedimiento utilizado para la incubación de suelos, es decir, incubación en una muestra única o en una serie de muestras separadas (véase el punto 1.7.1.2). Hay que procurar reducir al mínimo la pérdida de agua y permitir el intercambio de gas durante el ensayo (por ejemplo, pueden cubrirse los recipientes con láminas de polietileno perforado). Cuando se ensayen sustancias volátiles, deberán usarse recipientes sellables y herméticos cuyo tamaño sea tal que aproximadamente un cuarto de su volumen esté ocupado por la muestra de suelo.

Para la determinación de la respiración inducida por glucosa, se precisarán sistemas e instrumentos de incubación que permitan medir la producción de dióxido de carbono o el consumo de oxígeno. Se encontrarán ejemplos de este tipo de sistemas e instrumentos en la bibliografía, referencias (8) (9) (10) (11).

1.6.2 **Selección y número de suelos**

Se utilizará un único suelo cuyas características recomendadas serán las siguientes:

— contenido de arena: no inferior al 50 % ni superior al 75 %,

▼B

— pH: 5,5 - 7,5,

— contenido de carbono orgánico: 0,5 - 1,5 %

— deberá medirse la masa microbiana (12)(13), cuyo contenido de carbono deberá ser al menos el 1 % del total de carbono orgánico en el suelo.

En la mayoría de los casos, un suelo de estas características representa la situación más desfavorable, ya que la adsorción de la sustancia química de ensayo es mínima y su disponibilidad para la microflora es máxima. Por lo tanto, no son necesarios, por lo general, ensayos de otros suelos. Sin embargo, en algunas circunstancias, por ejemplo cuando la sustancia de ensayo esté indicada principalmente para determinados suelos, como los suelos forestales ácidos, o en el caso de productos químicos cargados electrostáticamente, puede resultar necesario utilizar un suelo adicional.

1.6.3 **Recogida y conservación de muestras de suelo**

1.6.3.1 *Recogida*

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del lugar donde se haya recogido el suelo de ensayo. En particular, localización precisa, cubierta vegetal, fechas de tratamiento con productos fitosanitarios, con abonos orgánicos e inorgánicos, adición de materiales biológicos o contaminación accidental. El lugar elegido para la recogida de suelo tiene que ser tal que permita un uso a largo plazo. Se consideran adecuados los pastos permanentes, los campos con cosechas anuales de cereales (excepto el maíz) o los abonos verdes sembrados densamente. El lugar donde se recojan las muestras no deberá haber sido tratado con productos fitosanitarios durante un mínimo de un año antes de la recogida de estas. Además, no deberá haberse aplicado ningún abono orgánico durante al menos seis meses. El uso de abonos minerales solo será aceptable cuando responda a las necesidades del cultivo, y en ese caso no deberán tomarse muestras hasta transcurridos, al menos, tres meses desde la aplicación del abono. Deberá evitarse el uso de suelo tratado con abonos de efectos biocidas conocidos (por ejemplo, cianamida de calcio).

Deberá evitarse la toma de muestras durante o inmediatamente después de períodos prolongados (de más de 30 días) de sequía o encharcamiento. En el caso de los suelos arados, deberán tomarse muestras a una profundidad de 0 a 20 cm. Cuando se trate de pastizales u otros suelos que no se aren durante períodos más largos (al menos un ciclo de cultivo), la profundidad máxima del muestreo podrá ser ligeramente superior a 20 cm (por ejemplo, 25 cm). Las muestras de suelo se transportarán en recipientes y en condiciones de temperatura que garanticen que las propiedades iniciales del suelo no se alteren significativamente.

1.6.3.2 *Conservación*

Es preferible el uso de muestras de suelo recién recogidas. Si no se puede evitar el almacenamiento en el laboratorio, las muestras de suelo podrán guardarse en la oscuridad a 4 ± 2 $^{o}$C durante un máximo de tres meses. Durante el almacenamiento, deberá asegurarse el mantenimiento de unas condiciones aerobias. Si se recogen muestras de suelo de zonas que estén heladas durante, al menos, tres meses al año, podrá considerarse la posibilidad de almacenarlas durante seis meses a - 18 $^{o}$C. Se medirá la biomasa microbiana de las muestras almacenadas antes de cada experimento. La cantidad de carbono en la biomasa deberá ser como mínimo el 1 % del total de carbono orgánico de la muestra de suelo (véase el punto 1.6.2).

▼B

1.6.4 **Manipulación y preparación del suelo para el ensayo**

1.6.4.1 *Preincubación*

Cuando las muestras de suelo hayan estado almacenadas (véanse los puntos 1.6.4.2 y 1.7.1.3), se recomienda preincubar durante un período de entre 2 y 28 días. La temperatura y el contenido de humedad del suelo durante la preincubación deberán ser semejantes a las que se den durante el ensayo (véanse los puntos 1.6.4.2 y 1.7.1.3).

1.6.4.2 *Características fisicoquímicas*

Se separarán manualmente los objetos grandes (por ejemplo, piedras, trozos de plantas, etc.) de la muestra de suelo y, a continuación, se tamizará la muestra por vía húmeda sin secar en exceso para obtener un tamaño de las partículas no superior a 2 mm. Deberá ajustarse el contenido de humedad de la muestra con agua destilada o desionizada para llegar a un valor entre el 40 % y el 60 % de la capacidad de retención de agua máxima.

1.6.5 **Preparación de la sustancia de ensayo para la aplicación al suelo**

La sustancia de ensayo se aplica normalmente utilizando un vehículo. El vehículo podrá ser agua (para las sustancias solubles en el agua) o un sólido inerte como arena fina de cuarzo (tamaño de las partículas: 0,1 - 0,5 mm). Se evitarán los vehículos líquidos distintos del agua (por ejemplo, disolventes orgánicos como la acetona o el cloroformo), porque pueden dañar la microflora. Si se usa arena como vehículo, podrá recubrirse con la sustancia de ensayo disuelta o suspendida en un disolvente apropiado. En tal caso, deberá eliminarse el disolvente por evaporación antes de mezclarse con la muestra de suelo. Para una distribución óptima de la sustancia de ensayo en el suelo, se recomienda una proporción de 10 g de arena por kilo de suelo (peso en seco). Las muestras de control se tratarán solo con la cantidad equivalente de agua y/o arena de cuarzo.

Cuando se ensayen sustancias químicas volátiles, deberán evitarse las pérdidas durante el tratamiento y se procurará conseguir una distribución homogénea en la muestra de suelo (por ejemplo, deberá inyectarse la sustancia de ensayo en la muestra en varios sitios).

1.6.6 **Concentraciones de ensayo**

Si se someten a ensayo productos fitosanitarios u otros productos químicos cuyas concentraciones en el medio ambiente sean predecibles, deberán utilizarse al menos dos concentraciones. La concentración más baja corresponderá, al menos, a la cantidad máxima que se prevé que llegue al suelo en la práctica, y la concentración más alta será un múltiplo de la concentración más baja. Las concentraciones de la sustancia de ensayo añadida al suelo se calcularán suponiendo una incorporación uniforme hasta una profundidad de 5 cm y una densidad aparente del suelo de 1,5. Para los productos agroquímicos que se aplican directamente al suelo o para las sustancias químicas para las cuales puede predecirse la cantidad que llega al suelo, las concentraciones de ensayo recomendadas son la concentración ambiental prevista (PEC) y cinco veces esa concentración. Las sustancias destinadas a ser aplicadas a los suelos varias veces en la misma temporada se ensayarán a las concentraciones resultantes de multiplicar la PEC por el número máximo de aplicaciones previsto. Sin embargo, la concentración máxima ensayada no deberá superar diez veces el índice máximo para una aplicación.

Si se ensayan productos no agroquímicos, se empleará una serie geométrica de, al menos, cinco concentraciones. Las concentraciones ensayadas deberán cubrir el intervalo necesario para determinar los valores $EC_X$.

▼B

1.7 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.7.1 **Condiciones de exposición**

1.7.1.1 *Tratamiento y control*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en tres partes de igual peso. Dos partes se mezclarán con el vehículo que contenga el producto, y la otra, con el vehículo sin el producto (control). Se recomienda un mínimo de tres ejemplares para ambos tipos de muestras, las tratadas y las no tratadas. Cuando se ensayen productos no agroquímicos, la muestra de suelo se dividirá en seis partes de igual peso. Cinco de las muestras se mezclarán con el vehículo que contenga la sustancia de ensayo, y la sexta, con el vehículo sin la sustancia. Se recomienda preparar tres ejemplares tanto para las muestras tratadas como las de control. Deberá procurarse una distribución homogénea de la sustancia de ensayo en las muestras tratadas. Durante la mezcla, se evitará la compactación de la muestra o la formación de grumos.

1.7.1.2 *Incubación de las muestras de suelo*

La incubación de las muestras de suelo puede hacerse de dos maneras: como dos muestras únicas, una de suelo tratado y otra de suelo no tratado, o como una serie de submuestras de igual tamaño de suelo tratado, por una parte, y de suelo no tratado, por otra. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, solo deberá hacerse el ensayo con una serie de submuestras separadas. Cuando las muestras de suelo se incuben en una muestra única, se prepararán grandes cantidades de suelo tratado y no tratado, y se tomarán las submuestras que deban analizarse según se necesite a lo largo del ensayo. La cantidad preparada inicialmente para las muestras tratadas y para las de control dependerá del tamaño de las submuestras, el número de ejemplares utilizados para el análisis y el número máximo previsto de períodos de muestreo. Deberán mezclarse bien las muestras de suelo incubadas como muestra única antes de preparar las submuestras. Cuando la incubación se haga en una serie muestras separadas, se dividirán las dos muestras, de suelo tratado y de suelo no tratado, en el número de submuestras requerido, y estas se utilizarán según se necesite. En los experimentos en los que puedan preverse más de dos tiempos de muestreo, habrán de prepararse las submuestras suficientes, teniendo en cuenta los ejemplares y los tiempos de muestreo. Deberán incubarse, al menos, tres ejemplares de las muestras de ensayo en condiciones aerobias (véase el punto 1.7.1.1). Durante todos los ensayos, se utilizarán recipientes adecuados con suficiente espacio libre para evitar la aparición de condiciones anaerobias. Sin embargo, cuando se ensayen sustancias volátiles, solo deberá realizarse el ensayo con una serie de submuestras separadas.

1.7.1.3 *Condiciones y duración del ensayo*

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura ambiente de 20± 2 °C. El contenido de humedad de las muestras se mantendrá durante el ensayo entre el 40 % y el 60 % de la capacidad de retención de agua máxima del suelo (véase el punto 1.6.4.2) con una variación máxima del ± 5 %. Podrá añadirse agua destilada y desionizada según se necesite.

La duración mínima del ensayo será de 28 días. Si se están ensayando productos agroquímicos, se compararán las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en las muestras tratada y de control. Si difieren en más del 25 % al 28º día, se continuará el ensayo hasta que se obtenga una diferencia igual o menor al 25 % o bien durante un máximo de 100 días. En el caso de los productos no agroquímicos, se pondrá fina al ensayo a los 28 días. Al 28º día, se determinarán las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en las muestras tratada y de control y se calcularán los valores $EC_X$.

▼B

1.7.2 **Toma de muestras y análisis de suelos**

1.7.2.1 *Calendario de toma de muestras*

Cuando se ensayen productos agroquímicos, se hará el análisis de tasas de respiración inducida por glucosa en las muestras de suelo los días 0, 7, 14 y 28. Cuando se necesite un ensayo prolongado, se efectuarán nuevas mediciones a intervalos de 14 días a partir del 28º día.

Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se utilizarán como mínimo cinco concentraciones de ensayo y se hará el análisis de la respiración inducida por glucosa en las muestras de suelo al principio (día 0) y al final del período de exposición (28 días). Si se considera necesario, podrá añadirse una medición intermedia, por ejemplo, al séptimo día. Se utilizarán los datos obtenidos al 28º día para hallar el valor $EC_X$ de la sustancia química. Si se desea, podrán utilizarse los datos de las muestras de control obtenidos el día 0 para estimar las cantidades iniciales de biomasa microbiana metabólicamente activa en el suelo (12).

1.7.2.2 *Medida de las tasas de respiración inducida por glucosa*

Se determinará la tasa de respiración inducida por glucosa en cada ejemplar de muestra tratada y de control en cada momento de muestreo. Se mezclarán las muestras de suelo con una cantidad de glucosa suficiente para suscitar una respuesta respiratoria máxima inmediata. Dicha cantidad de glucosa necesaria para suscitar una respuesta respiratoria máxima en un suelo dado puede determinarse en un ensayo preliminar utilizando una serie de concentraciones de glucosa (14). Sin embargo, en el caso de suelos arenosos con 0,5 - 1,5 % de carbono orgánico, suelen resultar suficientes de 2 000 mg a 4 000 mg de glucosa por kg de suelo (peso en seco). Es posible obtener un polvo mezclando la glucosa con arena de cuarzo limpia (10 g de arena/kg de suelo, peso en seco) y mezclarlo con el suelo de manera homogénea.

Se incubarán las muestras de suelo enmendadas con glucosa en un aparato adecuado para medir las tasas de respiración continuamente, cada hora o cada dos horas (véase el punto 1.6.1) a 20 ± 2 ºC. Se medirá el dióxido de carbono liberado o el oxígeno consumido durante 12 horas consecutivas, iniciándose las medidas lo antes posible, es decir, de 1 a 2 horas después de añadido el suplemento de glucosa. Se medirán las cantidades totales de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido durante las 12 horas y se determinarán las tasas de respiración promedio.

2 **RESULTADOS**

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Si se trata de productos agroquímicos, deberán registrarse las cantidades de dióxido de carbono liberado u oxígeno consumido en cada ejemplar de muestra de suelo, tabulándose además los valores promedio de todos los ejemplares. Se evaluarán los resultados mediante métodos estadísticos apropiados y generalmente aceptables (por ejemplo, prueba F, nivel de significación del 5 %). Las tasas de respiración inducida por glucosa se expresan en mg de dióxido de carbono/kg suelo, peso en seco/h o en mg oxígeno/suelo, peso en seco/h. Se comparará la tasa promedio de formación de dióxido de carbono o la tasa promedio de consumo de oxígeno en cada tratamiento con la de control, calculándose la desviación porcentual con respecto al control.

▼B

Cuando se ensayen productos no agroquímicos, se determinarán las cantidades de dióxido de carbono liberadas o de oxígeno consumidas por cada ejemplar y se trazará una curva dosis-respuesta para estimar los valores $EC_x$. Se compararán las tasas de respiración inducida por glucosa (es decir, mg de dióxido de carbono/kg suelo, peso en seco/h o mg oxígeno/suelo, peso en seco/h) que presenten las muestras tratadas transcurridos 28 días con las que presenten las muestras de control. A partir de estos datos, se calcularán los valores porcentuales de inhibición para cada concentración de ensayo. Se representarán gráficamente estos porcentajes frente a la concentración, utilizándose luego procedimientos estadísticos para calcular los valores $EC_X$. Utilizando asimismo procedimientos estándar, se determinarán los limites de confianza (p = 0,95) para los $EC_X$ calculados (10)(11)(12).

2.2 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Cuando se evalúen los resultados de los ensayos con productos agroquímicos y la diferencia en las tasas de respiración entre el tratamiento más bajo (es decir, la concentración máxima prevista) y la muestra de control no supere el 25 % en ningún momento de muestreo a partir del $28^2$ día, podrá considerarse que el producto no tiene influencia a largo plazo en la transformación de carbono en el suelo. Cuando se evalúen los resultados de ensayos con productos no agroquímicos, se utilizarán los valores $EC_{50}$, $EC_{25}$ y/o $EC_{10}$

3 **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

Identificación completa del suelo utilizado, incluyendo:

— referencia geográfica del lugar (latitud y longitud),

— información sobre la historia del lugar (es decir, cubierta vegetal, tratamientos con productos fitosanitarios, tratamientos con abonos, contaminación accidental, etc.),

— tipo de uso (por ejemplo, suelo agrícola, bosque, etc.),

— profundidad de muestreo (cm),

— contenido de arena/limo/arcilla (% peso seco),

— pH (en agua),

— contenido de carbono orgánico (% peso seco),

— contenido de nitrógeno (% peso seco),

— capacidad de intercambio de cationes (mmol/kg),

— biomasa microbiana inicial en porcentaje del carbono orgánico total,

— referencia de los métodos utilizados para la determinación de cada parámetro,

— toda la información sobre la recogida y almacenamiento de las muestras de suelo,

— datos de la preincubación del suelo, si procede.

▼B

Sustancia de ensayo:

— naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas,

— identificación química, en su caso, incluyendo fórmula estructural, pureza (es decir, en el caso de los productos fitosanitarios, el porcentaje de principio activo) y contenido de nitrógeno.

Condiciones de ensayo:

— información sobre la adición al suelo de sustrato orgánico,

— número de concentraciones de la sustancia de ensayo utilizadas y, en su caso, justificación de las concentraciones seleccionadas,

— datos de la aplicación de la sustancia de ensayo al suelo,

— temperatura de incubación,

— contenido de humedad al principio y durante el ensayo,

— método de incubación del suelo utilizado (es decir, muestra única o serie de submuestras separadas),

— número de ejemplares,

— tiempos de muestreo.

Resultados:

— método y equipo utilizados para medir las tasas de respiración,

— datos tabulados, incluyendo los distintos valores y los valores promedio de las cantidades de dióxido de carbono u oxígeno,

— variación entre los ejemplares de las muestras tratadas y las muestras de control,

— explicación de la correcciones efectuadas en los cálculos, si procede,

— variación porcentual de las tasas de respiración inducida por glucosa en cada momento de muestreo o, si procede, el valor $EC_{50}$ con un límite de confianza del 95 %, otros valores $EC_x$ (es decir, $EC_{25}$ o $EC_{10}$) con intervalos de confianza, y una gráfica de la curva dosis-respuesta,

— tratamiento estadístico de los resultados, si procede,

— cualquier información u observación complementaria de interés para la interpretación de los resultados.

4 **REFERENCIAS**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1-16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality — Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in «Pesticide Effects on Soil Microflora». Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3:45-60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in «Methods of Soil Analysis — Part 2: Chemical and Microbiological Properties». Agronomy Monograph N$^{o}$ 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41:831-871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality — Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77-81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation- extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). EinfluB von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113-120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99-113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

## C.23. TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN EL SUELO

### 1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 307 (2002).

### 1.1 INTRODUCCIÓN

El presente método se basa en las actuales directrices (1)(2)(3)(4)(5)-(6)(7)(8)(9). El método está pensado para evaluar la transformación aerobia y anaerobia de las sustancias químicas en el suelo. Con los experimentos se pretende determinar: i) la tasa de transformación de la sustancia de ensayo, y ii) la naturaleza y las tasas de formación y disminución de los productos de transformación a los que pueden estar expuestos los vegetales y los organismos del suelo. Se precisa de dichos estudios para las sustancias químicas que se aplican directamente al suelo o es probable que alcancen el medio edáfico. Los resultados de los estudios pueden utilizarse igualmente para elaborar protocolos de muestreo y análisis para estudios de campo afines.

Por regla general, para evaluar las vías de transformación bastará efectuar estudios aerobios y anaerobios con un tipo de suelo (8)(10)(l 1). Las tasas de transformación, sin embargo, deberán determinarse por lo menos en otros tres suelos (8)(10).

En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (10) se alcanzó un acuerdo, en particular, sobre el número y tipos de suelos que deben utilizarse en estos ensayos. Los tipos de suelos sometidos a ensayo deben ser representativos de las condiciones ambientales en las que tendrá lugar el uso o la liberación. Por ejemplo, las sustancias químicas que vayan a liberarse en climas tropicales o subtropicales deben ensayarse en ferralsoles y nitosoles (sistema FAO). Dicho seminario formuló asimismo recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de suelos (15). También se examina en este método el uso de suelos de (arroz) paddy.

### 1.2 DEFINICIONES

**Sustancia de ensayo:** cualquier sustancia, sea el compuesto original o los correspondientes productos de transformación.

**Productos de transformación:** todas las sustancias resultantes de las reacciones de transformación biótica o abiótica de la sustancia de ensayo, incluido el $CO_2$ y los productos que se encuentran en los residuos ligados.

**Residuos ligados:** compuestos del suelo, la planta o el animal que persisten en la matriz en forma de sustancia original o de sus productos de transformación/metabolitos tras la extracción. El método de extracción no debe modificar sustancialmente ni los propios compuestos ni la estructura de la matriz. La naturaleza del vínculo puede aclararse parcialmente mediante métodos de extracción que alteren la matriz y técnicas analíticas sofisticadas. Así por ejemplo, hasta la fecha se han identificado de esta manera enlaces covalentes, iónicos y de sorción, así como atrapamientos. En general, la formación de residuos ligados reduce de manera significativa la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (12) [modificado de IUPAC 1984 (13)].

**Transformación aerobia:** reacciones que se producen en presencia de oxígeno molecular (14).

▼B

**Transformación anaerobia:** reacciones que se producen en ausencia de oxígeno molecular (14).

**Suelo:** mezcla de constituyentes químicos minerales y orgánicos; estos últimos contienen compuestos de elevado contenido en carbono y en nitrógeno y de peso molecular elevado, animados por pequeños organismos (principalmente microorganismos). El suelo puede manipularse en dos estados:

a) no perturbado, tal como se ha desarrollado en el tiempo, en capas características de diversos tipos de suelo;

b) perturbado, como suele encontrarse en los campos cultivables o como se presenta cuando se toman muestras mediante excavación para utilizarlas en el presente método de ensayo (14).

**Mineralización:** degradación completa de un compuesto orgánico a $CO_2$ y $H_2O$ en condiciones aerobias y a $CH_4$, $CO_2$ y $H_2O$ en condiciones anaerobias. En el contexto del presente método, cuando se utiliza un compuesto marcado con $^{14}C$, mineralización significa la amplia degradación durante la que se oxida un átomo de carbono marcado con liberación de la cantidad apropiada de $^{14}CO_2$ (14).

**Semivida:** to, s, es el tiempo que tarda la transformación del 50 % de una sustancia de ensayo cuando puede describirse dicha transformación mediante una cinética de primer orden; es independiente de la concentración.

**$DT_{50}$ (tiempo de desaparición 50):** es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 50 %; es distinto de la semivida $t_{0,5}$ cuando la transformación no sigue una cinética de primer orden.

**$DT_{75}$ (tiempo de desaparición 75):** es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 75 %.

**$DT_{90}$ (tiempo de desaparición 90):** es el tiempo que tarda la concentración de la sustancia de ensayo en reducirse en un 90 %.

1.3 SUSTANCIAS DE REFERENCIA

Deberán utilizarse sustancias de referencia para la caracterización y/o identificación de los productos de transformación por métodos espectroscópicos o cromatográficos.

1.4 APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método es aplicable a todas las sustancias químicas (no marcadas o marcadas radiactivamente) para las que se dispone de un método analítico de suficiente exactitud y sensibilidad. Es aplicable a compuestos ligeramente volátiles, no volátiles, solubles en agua o insolubles en agua. El ensayo no deberá aplicarse a sustancias químicas que sean muy volátiles a partir del suelo (por ejemplo, fumigantes o disolventes orgánicos) y, por tanto, no se puedan mantener en el suelo en las condiciones experimentales del presente ensayo.

▼B

1.5 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Para medir la tasa de transformación podrá utilizarse una sustancia de ensayo marcada o no marcada. Para estudiar la vía de transformación y establecer un balance de materia se requiere material marcado. Se recomienda el marcado con $^{14}C$, pero también puede resultar de utilidad el uso de otros isótopos, tales como $^{13}C$, $^{15}N$, $^{3}H$ o $^{32}P$. El marcador deberá ubicarse, en la medida de lo posible, en la parte o las partes más estables de la molécula ([1]). La pureza de la sustancia de ensayo deberá ser de al menos el 95 %.

Antes de realizar un ensayo sobre la transformación aerobia o anaerobia en el suelo, deberá contarse con la siguiente información relativa a la sustancia de ensayo.

a) solubilidad en agua (Método A.6);

b) solubilidad en disolventes orgánicos;

c) presión de vapor (Método A.4) y constante de la ley de Henry;

d) coeficiente de reparto n-octanol/agua (Método A.8);

e) estabilidad química en la oscuridad (hidrólisis) (Método C.7);

f) $pK_a$ si una molécula es susceptible de protonación o desprotonación [Directriz 112 de la OCDE] (16).

También pueden resultar de utilidad los datos sobre la toxicidad de la sustancia de ensayo para los microorganismos del suelo [Métodos de ensayo C.21 y C.22] (16).

Deberá contarse con métodos analíticos (incluidos métodos de extracción y depuración) para la cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación.

1.6 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

Se tratan las muestras de suelo con la sustancia de ensayo y se incuban en la oscuridad en un matraz biométrico o en sistemas de flujo en condiciones de laboratorio controladas (a humedad del suelo y temperatura constantes). A intervalos de tiempo adecuados, se extraen muestras del suelo y se analizan en ellas la sustancia original y los productos de transformación. También se recogen los productos volátiles para su análisis con los dispositivos de absorción adecuados. Utilizando material marcado con C es posible medir las diversas tasas de mineralización de la sustancia de ensayo atrapando el $^{14}CO_2$ resultante y establecer un balance de materia, incluyendo la formación de residuos ligados al suelo.

1.7 CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1 **Recuperación**

La extracción y el análisis de muestras de suelo cuando menos duplicadas inmediatamente después de la adición de la sustancia de ensayo dan una primera indicación de la repetibilidad del método analítico y de la uniformidad del procedimiento de aplicación de la sustancia de ensayo. Los valores de recuperación para fases posteriores del experimento los dan los balances másicos respectivos. Dichos valores deberán situarse entre el 90 % y el 110 % para sustancias químicas marcadas (8) y entre el 70 % y el 110 % para sustancias químicas no marcadas (3).

([1]) Por ejemplo, si la sustancia de ensayo contiene un anillo, es preciso marcar ese anillo: si contiene dos o más anillos, puede resultar necesario efectuar estudios separados para evaluar el destino de cada anillo marcado y obtener información adecuada sobre la formación de los productos de transformación.

▼B

1.7.2 **Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

La repetibilidad del método analítico (excluida la eficiencia de extracción inicial) para cuantificar la sustancia de ensayo y los productos de transformación puede comprobarse realizando un análisis por duplicado del mismo extracto de suelo incubado durante tiempo suficiente para que se formen productos de transformación.

El límite de detección (LOD) del método analítico de la sustancia de ensayo y de los productos de transformación deberá alcanzar, como mínimo, el menor de los siguientes valores: 0,01 $mg\text{-}kg^{-1}$ de suelo (como sustancia de ensayo) o un 1 % de la dosis aplicada. También deberá especificarse el límite de cuantificación (LOQ).

1.7.3 **Exactitud de los datos de transformación**

El análisis de regresión de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo facilita la información apropiada sobre, la fiabilidad de la curva de transformación y permite calcular los límites de confianza de las semividas (en el caso de la cinética de pseudo primer orden) o los valores $DT_{50}$ y, si procede, $DT_{75}$ y $DT_{90}$.

1.8 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.8.1 **Equipos y reactivos químicos**

Los sistemas de incubación consisten en sistemas cerrados estáticos o sistemas de flujo adecuados (7) (17). En las figuras 1 y 2 se muestran ejemplos de, respectivamente, aparatos de flujo de incubación de suelo y matraces biométricos adecuados. Los dos tipos de sistema de incubación tienen sus ventajas y sus limitaciones (7) (17).

Se precisa el equipo estándar de laboratorio y, en particular:

— instrumentos analíticos tales como equipos GLC, HPLC, TLC, incluidos los sistemas de detección adecuados para el análisis de sustancias marcadas o no marcadas o el método de dilución isotópica inversa,

— instrumentos de identificación (por ejemplo, MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR, etc.),

— contador de centelleo de líquidos,

— cámara de combustión oxidante de material radiactivo,

— centrifugadora,

— aparato de extracción (por ejemplo, tubos de centrifugación para extracción en frío y aparato Soxhlet para extracción continua a reflujo),

— instrumental para concentrar soluciones y extractos (por ejemplo, evaporador rotatorio),

— baño maria,

— dispositivo mezclador mecánico (por ejemplo, amasadora, mezcladora rotatoria).

▼B

Entre los reactivos químicos figuran, por ejemplo:

— NaOH, pureza de grado analítico, 2 mol $dm^{-3}$, u otra base apropiada (por ejemplo, KOH, etanolamina),

— $H_2SO_4$, pureza de grado analítico, 0,05 mol $dm^{-3}$

— glicol etileno, pureza de grado analítico,

— materiales sólidos de absorción, tales como cal sodada y piezas de poliuretano,

— disolventes orgánicos, pureza de grado analítico, tales como acetona, metanol, etc.,

— líquido de centelleo.

1.8.2 **Aplicación de la sustancia de ensayo**

Para incorporarla al suelo y distribuirla en él, podrá disolverse la sustancia de ensayo en agua (desionizada o destilada) o, si resulta necesario, en cantidades mínimas de acetona u otro disolvente orgánico (6) en el que la sustancia de ensayo sea suficientemente soluble y estable. No obstante, la cantidad de disolvente seleccionada no deberá tener una influencia significativa sobre la actividad microbiana del suelo (véanse los puntos 1.5 y 1.9.2-1.9.3. Deberá evitarse el uso de disolventes inhibidores de la actividad microbiana, tales como cloroformo, diclorometano y otros disolventes halogenados.

Podrá incorporarse asimismo la sustancia de ensayo en forma sólida, por ejemplo, mezclada con arena de cuarzo (6) o en una pequeña submuestra del suelo sometido a ensayo que se haya secado al aire y esterilizado. Si se incorpora la sustancia de ensayo utilizando un disolvente, deberá permitirse que este se evapore antes de incorporar la submuestra a la muestra de suelo original no estéril.

Para las sustancias químicas ordinarias, cuya principal vía de entrada en el suelo es a través de los lodos de depuración o la actividad agraria, deberá incorporarse primero la sustancia de ensayo al lodo, que luego se introducirá en la muestra de suelo, (véanse los puntos 1.9.2 y 1.9.3).

No se recomienda la utilización rutinaria de productos formulados. No obstante, su utilización podría constituir una alternativa apropiada, por ejemplo, en el caso de sustancias de ensayo poco solubles.

1.8.3 **Suelos**

1.8.3.1 *Selección de suelos*

Para determinar la vía de transformación, podrá utilizarse un suelo representativo; se recomienda un suelo franco arenoso o franco limoso o franco o arenoso franco [según la clasificación de FAO y USDA (18)] con un pH de 5,5 - 8,0, un contenido de carbono orgánico de 0,5 - 2,5 % y una biomasa microbiana de al menos 1 % del carbono orgánico total (10).

Para estudios de tasa de transformación deberán utilizarse al menos tres suelos adicionales representativos de la gama de suelos relevante. Estos suelos deben variar en cuanto a contenido de carbono orgánico, pH, contenido de arcilla y biomasa microbiana (10).

▼B

Deberán caracterizarse todos los suelos, cuando menos, en cuanto a textura (% arena, % limo, % arcilla) [según la clasificación de FAO y USDA (18)], pH, capacidad de intercambio de cationes, carbono orgánico, densidad aparente, característica de retención de agua ([1]) y biomasa microbiana (solo para estudios aerobios). Cualquier otra información sobre las propiedades del suelo podría resultar de utilidad para la interpretación de los resultados. Para la determinación de las características del suelo, podrán utilizarse los métodos recomendados en las referencias (19)(20)(21)(22)(23). La biomasa microbiana se determinará utilizando el método de respiración inducida por el sustrato (SIR) (25)(26) o un método alternativo (20).

1.8.3.2 *Recogida, manipulación y conservación de suelos*

Deberá contarse con información detallada sobre la historia del lugar donde se haya recogido el suelo de ensayo. En particular, localización precisa, cubierta vegetal, tratamientos con sustancias químicas, tratamientos con abonos orgánicos e inorgánicos, adición de materiales biológicos u otro tipo de contaminación. No deberán utilizarse para estudios sobre transformación suelos que hayan sido tratados con la sustancia de ensayo o un análogo estructural de la misma dentro de los cuatro años precedentes (10)(15).

La muestra deberá haber sido recogida recientemente (del horizonte A o capa superior de 20 cm) y su contenido en agua deberá facilitar su tamizado. Salvo en el caso de los suelos de arrozales paddy, deberá evitarse la toma de muestras durante o inmediatamente después de un largo período (> 30 días) de sequía, helada o inundación (14). Las muestras deberán transportarse de manera que el contenido en agua del suelo varíe lo menos posible y mantenerse en la oscuridad y ventiladas en la mayor medida posible. Suele estar indicado el uso de una bolsa de polietileno sin cerrar completamente.

Una vez tomada la muestra, deberá procesarse el suelo lo antes posible. Deberá retirarse la vegetación, la fauna edáfica de mayor tamaño y las piedras antes de hacer pasar el suelo por un tamiz de 2 mm que permita retirar los restos de vegetales y animales y pequeñas piedras. Se procurará evitar el secado y aplastamiento excesivos del suelo antes del tamizado (15).

Cuando resulte difícil tomar muestras en invierno (por hallarse el suelo helado o cubierto por una capa de nieve), podrá extraerse de un lote de suelo almacenado en el invernadero bajo cubierta vegetal (por ejemplo, hierba o mezcla de hierba y trébol). Pese a preferirse claramente los estudios con suelos recién recogidos del campo, si es preciso almacenar el suelo recogido y procesado antes de comenzar el estudio, las condiciones de conservación deberán ser las adecuadas y el plazo de almacenamiento limitado (4 ± 2 °C durante un máximo de tres meses) para mantener la actividad microbiana ([2]). Se encontrarán instrucciones detalladas sobre la recogida, manipulación y conservación de suelos con vistas a su uso en experimentos de biotransformación en (8)(10)(15)(26)(27).

([1]) La característica de retención de agua de un suelo puede medirse como capacidad de campo, como capacidad de retención de agua o como tensión de succión de agua (pF). Más explicaciones en el anexo 1. Deberá consignarse en el informe del ensayo si las características de retención de agua y la densidad aparente de los suelos se determinaron en muestras no perturbadas o en muestras perturbadas (procesadas).

([2]) Según los resultados de recientes investigaciones, los suelos de las zonas templadas pueden almacenarse también a - 20 °C durante más de tres meses (28) (29) sin pérdida significativa de actividad microbiana.

▼B

Antes de utilizar en este ensayo el suelo procesado, deberá preincubarse este para hacer posible la germinación y eliminación de las semillas y restablecer el equilibrio del metabolismo microbiano tras el paso de las condiciones de muestreo o conservación a las de incubación. En general resulta adecuado un período de preincubación de entre 2 y 28 días en condiciones de temperatura y humedad próximas a las del ensayo real (15). La suma de los períodos de conservación y de preincubación no deberá exceder de tres meses.

1.9 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.9.1 **Condiciones de ensayo**

1.9.1.1 *Temperatura del ensayo*

Durante la totalidad del período de ensayo, deberán incubarse los suelos en la oscuridad a una temperatura constante que sea representativa de las condiciones climáticas en que tendrá lugar el uso o la liberación. Se recomienda una temperatura de 20 ± 2 °C para todas las sustancias de ensayo que puedan llegar al suelo en climas templados. Deberá controlarse esta temperatura.

Si se trata de sustancias químicas aplicadas o liberadas en climas más fríos (por ejemplo, en países septentrionales, durante el otoño o el invierno), deberán incubarse muestras de suelo adicionales pero a una temperatura inferior (por ejemplo, 10± 2 °C).

1.9.1.2 *Contenido de humedad*

Para los ensayos de transformación en condiciones aerobias, deberá ajustarse el contenido de humedad ([1]) del suelo a un pF situado entre 2,0 y 2,5 y mantenerse en ese valor (3) El contenido de humedad del suelo se expresa como cociente entre masa de agua y masa de suelo seco y debe ser controlado periódicamente (por ejemplo, a intervalos de 2 semanas) pesando los recipientes de incubación y compensando las pérdidas de agua mediante la adición de, preferiblemente, agua de grifo esterilizada por filtración. Habrá que procurar evitar o reducir al mínimo las pérdidas de sustancia de ensayo y/o productos de transformación por volatilización y/o fotodegradación (en su caso) durante la adición de humedad.

Para los ensayos de transformación en condiciones anaerobias y de arrozal, se satura de agua el suelo mediante inundación.

1.9.1.3 *Condiciones aerobias de incubación*

En los sistemas de flujo, se mantendrán las condiciones aerobias mediante baldeo intermitente o ventilación continua con aire húmedo. En los matraces biométricos, se mantendrá el intercambio de aire mediante difusión.

1.9.1.4 *Condiciones aerobias estériles*

Con el fin de obtener información sobre la importancia de la transformación abiótica de una sustancia de ensayo, las muestras de suelo podrán ser esterilizadas [sobre métodos de esterilización, véanse las referencias (16) y (29)], tratadas con una sustancia de ensayo estéril (por ejemplo, adición de solución a través de un filtro estéril) y aireadas con aire humidificado estéril según se describe en el punto 1.9.1.3. En el caso de los suelos de arrozal, será preciso esterilizar el suelo y el agua, y efectuar la incubación según se describe en el punto 1.9.1.6.

([1]) El suelo no deberá estar ni demasiado húmedo ni demasiado seco para mantener una aireación y nutrición adecuadas de la microflora edáfica. El contenido de humedad recomendado para un crecimiento microbiano óptimo se sitúa entre 40-60 % de capacidad de retención de agua (WHC) y entre 0,1 - 0,33 bar (6). Este último intervalo equivale a un pF comprendido entre 2,0 y 2,5. En el anexo 2 se dan los contenidos de humedad típicos de varios tipos de suelo.

▼B

1.9.1.5 *Condiciones anaerobias de incubación*

Para crear y mantener unas condiciones anaerobias, se procede a cubrir de agua (capa de 1-3 cm de agua) el suelo previamente tratado con la sustancia de ensayo e incubado en condiciones aerobias durante 30 días o una semivida o $DT_{50}$ (el valor que sea más pequeño) y a inyectar un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón) en el sistema de incubación ([1]). El sistema de ensayo deberá permitir la medición del pH, la concentración de oxígeno y el potencial redox e incluir dispositivos de fijación de productos volátiles. El sistema biométrico deberá estar cerrado, para evitar la entrada de aire por difusión.

1.9.1.6 *Condiciones de incubación de arrozal*

Para estudiar la transformación en suelos de arrozal, se inundará el suelo con una capa de agua de 1-5 cm y se aplica la sustancia de ensayo a la fase acuosa (9). Se recomienda que la profundidad del suelo sea de al menos 5 cm. El sistema se ventila con aire como en condiciones aerobias. Deberán controlarse y registrarse el pH, la concentración de oxígeno y el potencial redox de la capa acuosa. Será necesario un período de preincubación de al menos dos semanas antes de dar comienzo a los estudios de transformación (véase el punto 1.8.3.2).

1.9.1.7 *Duración del ensayo*

Los estudios de tasa y vía no deberán exceder normalmente de 120 días ([2]) (3)(6)(8), porque transcurrido ese plazo es de esperar un decrecimiento de la actividad microbiana del suelo con el tiempo en un sistema artificial de laboratorio sin posibilidad de reconstitución natural. Cuando resulte necesario para caracterizar el declive de la sustancia de ensayo y la formación y declive de los principales productos de transformación, podrán prolongarse los estudios durante períodos más largos (por ejemplo, 6 o 12 meses) (8). El uso de un período de incubación más largo deberá quedar justificado en el informe del ensayo y acompañarse de medidas de biomasa durante y al final del período.

1.9.2 **Realización del ensayo**

Se colocan de 50 a 200 g de suelo (peso seco) en cada recipiente de incubación (véanse las figuras 1 y 2 del anexo 3) y se trata el suelo con la sustancia de ensayo mediante uno de los métodos descritos en el punto 1.8.2. Cuando se utilicen disolventes orgánicos para la aplicación de la sustancia de ensayo, deberán retirarse del suelo por evaporación. A continuación, se mezcla bien el suelo con una espátula y/o agitando el recipiente. Si el estudio se realiza en condiciones de arrozal, se mezclarán bien el suelo y el agua tras la aplicación de la sustancia de ensayo. Se analizarán pequeñas partes alícuotas (por ejemplo, 1 g) de los suelos tratados para comprobar la distribución uniforme de la sustancia de ensayo. Más adelante se presentan métodos alternativos.

([1]) Las condiciones aerobias son dominantes en los suelos superficiales e incluso en los situados debajo de la superficie, según demuestra un proyecto de investigación patrocinado por la UE [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270-277, 17-21 August 1992, Sigtuna, Sweden]. Las condiciones anaerobias se presentan tan solo ocasionalmente con motivo de la inundación del suelo tras lluvias intensas o cuando se establecen las condiciones de arrozal.

([2]) Los estudios aerobios podrían terminar mucho antes de estos 120 días siempre que se haya establecido manifiestamente la vía de transformación última y la mineralización última. Es posible asimismo la terminación del ensayo a los 120 días, o cuando se haya transformado el 90 % de la sustancia de ensayo, pero solo si se ha formado al menos un 5 % de $CO_2$.

▼B

La tasa de tratamiento debe corresponder a la tasa de aplicación más elevada de un producto fitosanitario recomendada en las instrucciones de empleo y a incorporación uniforme a una profundidad apropiada en el campo [por ejemplo, capa superior ([1]) de 10 cm de suelo]. Por ejemplo, para productos químicos aplicados sobre el follaje o el suelo sin incorporación, la profundidad apropiada para calcular la cantidad de producto químico que debe añadirse a cada recipiente es de 2,5 cm. Para productos químicos incorporados al suelo, la profundidad apropiada es la profundidad de incorporación especificada en las instrucciones de empleo. Para productos químicos ordinarios, deberá calcularse la tasa de aplicación sobre la base de la vía de penetración más importante; por ejemplo, cuando la vía principal de penetración en el suelo sean los lodos de depuración, deberá dosificarse el producto químico en el lodo a una concentración que corresponda a la concentración prevista en el lodo y deberá añadirse al suelo una cantidad de lodo que corresponda a su carga normal en los suelos agrícolas. Si esta concentración no es suficientemente elevada para permitir la identificación de los principales productos de transformación, podrá proceder la incubación de muestras de suelo independientes que contengan tasas superiores, pero deben evitarse las tasas excesivas que influyan en las funciones microbianas del suelo (véanse los puntos 1.5 y 1.8.2).

Alternativamente, se podrá tratar un lote de suelo mayor (de 1 a 2 kg) con la sustancia de ensayo, mezclándolo bien en una máquina mezcladora adecuada y transfiriéndolo luego en porciones pequeñas de 50 a 200 g a los recipientes de incubación (por ejemplo utilizando separadores de muestras). Se analizarán pequeñas partes alícuotas (por ejemplo, 1 g) del lote de suelo tratado para comprobar la distribución uniforme de la sustancia de ensayo. Resulta preferible este procedimiento porque hace posible una distribución más uniforme de la sustancia de ensayo en el suelo.

Por otra parte, se incuban muestras de suelo no tratadas en las mismas condiciones (aerobias) de las muestras tratadas con la sustancia de ensayo. Estas muestras se utilizan para medición de biomasa durante los estudios y al finalizar estos.

Cuando se aplica al suelo la sustancia de ensayo disuelta en uno o más disolventes orgánicos, se incuban muestras de suelo tratadas con la misma cantidad de disolvente(s) en las mismas condiciones (aerobias) que las muestras tratadas con la sustancia de ensayo. Estas muestras se utilizan para medir la biomasa al comienzo, durante y al final de los estudios, con el fin de comprobar los efectos del disolvente o los disolventes en la biomasa microbiana.

Los recipientes con el suelo tratado serán conectados al sistema de flujo descrito en la figura 1 o cerrados con la columna de absorción mostrada en la figura 2 (véase el anexo 3).

([1]) La concentración inicial en una superficie se calcula utilizando la ecuación siguiente:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d[kg_{soil}/m^3]}$$

$C_{soil}$ = concentración inicial en el suelo [$mg.kg^{-1}$]

A = tasa de aplicación [$kg.ha^{-1}$]; l = espesor de la capa de suelo en el campo [m]; d = densidad aparente en seco del suelo [$kg\text{-}m^{-3}$].

A título indicativo, una tasa de aplicación de 1 $kg.ha^{-1}$ da por resultado una concentración en el suelo de aproximadamente 1 $mg.kg^{-1}$ en una capa de 10 cm (supuesta una densidad aparente de 1 g . $cm^{-3}$).

▼B

1.9.3 **Muestreo y medidas**

Se retirarán los recipientes de incubación duplicados a intervalos de tiempo apropiados, extrayéndose muestras de suelo con disolventes adecuados de distinta polaridad y analizándose para medir la sustancia de ensayo y/o los productos de transformación. Un estudio bien diseñado deberá incluir recipientes suficientes, de manera que puedan sacrificarse dos en cada toma de muestras. De la misma manera, se retirarán soluciones de absorción o materiales sólidos de absorción a distintos intervalos temporales (de 7 días durante el primer mes y de 17 días posteriormente) durante y al final de la incubación de cada muestra de suelo y se analizan para medir productos volátiles. Además de la muestra de suelo tomada directamente tras la aplicación (muestra del día cero), deberán incluirse al menos 5 puntos de muestreo adicionales. Se escogerán los intervalos de tiempo de manera que se pueda determinar el patrón de declive de la sustancia de ensayo y los patrones de formación y declive de los productos de transformación (por ejemplo, 0, 1, 3, 7 días; 2,3 semanas; 1, 2, 3 meses, etc.).

Cuando se use una sustancia de ensayo marcada con $^{14}C$, se cuantificará la radiactividad no extraíble mediante combustión y se calculará un balance de materia para cada intervalo de muestreo.

En caso de incubación anaerobia o de arrozal, se podrán analizar conjuntamente las fases de suelo y agua para medir la sustancia de ensayo y los productos de transformación, o separarlas por filtración o centrifugado antes de la extracción y el análisis.

1.9.4 **Ensayos facultativos**

Podría resultar de utilidad la realización de estudios aerobios no estériles para otros valores de temperatura y humedad del suelo para estimar la influencia de la temperatura y la humedad del suelo sobre la tasa de transformación de una sustancia de ensayo y/o de sus productos de transformación en el suelo.

Puede intentarse otra caracterización de la radiactividad no extraíble utilizando, por ejemplo, extracción mediante fluido supercrítico.

2 **RESULTADOS**

2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Las cantidades de sustancia de ensayo, productos de transformación, sustancias volátiles (solo en porcentaje) y no extraíbles se expresarán en porcentaje de la concentración inicial aplicada y, cuando proceda, en $mg.kg^{-1}$ de suelo (sobre la base del peso del suelo en seco) para cada intervalo de muestreo. El balance de materia se expresará en porcentaje de la concentración inicial aplicada para cada intervalo de muestreo. La representación gráfica de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo permitirá estimar la semivida de su transformación o $DT_{50}$. Deberán identificarse los principales productos de transformación y se representarán gráficamente sus concentraciones en función del tiempo para mostrar sus tasas de formación y declive. Se considerará producto de transformación principal cualquier producto que represente ≥ 10 % de la dosis aplicada en cualquier momento del estudio.

Los productos volátiles fijados dan una indicación de la volatilidad potencial de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación a partir del suelo.

▼B

Se obtendrán determinaciones más exactas de las semividas o valores $DT_{50}$ y, si procede, valores $DT_{75}$ y $DT_{90}$, mediante cálculos con los modelos cinéticos apropiados. Se consignarán los valores de semivida y $DT_{50}$ junto con la descripción del modelo utilizado, el orden de la cinética y el coeficiente de determinación ($r^2$). Se prefiere la cinética de primer orden salvo que $r^2 < 0{,}7$. Si procede, se aplicarán los cálculos asimismo a los principales productos de transformación. En las referencias (31) a (35) se describen ejemplos de modelos adecuados.

Si se trata de estudios de tasas efectuados a varias temperaturas, las tasas de transformación deberán describirse como función de la temperatura dentro del intervalo de temperaturas experimental utilizando la relación de Arrhenius de la forma:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ o } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

donde ln A y B son constantes de regresión que corresponden a la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente, de una recta de mejor ajuste generada por regresión lineal de ln k frente a 1/T, k es la constante de tasa a temperatura T y T es la temperatura en Kelvin. Deberá prestarse atención al intervalo limitado de temperaturas en el que será válida la relación de Arrhenius en el caso de que la transformación esté gobernada por la acción microbiana.

2.2 EVALUACIÓN E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Aunque los estudios se realizan en un sistema artificial de laboratorio, los resultados permitirán estimar la tasa de transformación de la sustancia de ensayo e igualmente la tasa de formación y declive de los productos de transformación en condiciones de campo (36)(37).

El estudio de la vía de transformación de una sustancia de ensayo aporta información sobre la transformación estructural de la sustancia aplicada en el suelo por reacciones químicas y microbianas.

3 **INFORME**

INFORME DEL ENSAYO

El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

Sustancia de ensayo:

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la(s) posición(es) del marcador(es) cuando se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés (véase el punto 1.5),

— pureza (impurezas) de la sustancia de ensayo,

— pureza radioquímica de la sustancia química marcada y actividad específica (si procede).

Sustancias de referencia:

— nombre químico y estructura de las sustancias de referencia utilizadas para caracterizar y/o identificar los productos de transformación.

Suelos de ensayo:

— detalles del lugar donde se recogieron,

— fecha y procedimiento de muestreo,

▼B

— propiedades de los suelos, tales como pH, contenido de carbono orgánico, textura (% arena, % limo, % arcilla), capacidad de intercambio de cationes, densidad aparente, característica de retención de agua y biomasa microbiana,

— duración del almacenamiento y condiciones de conservación (si se ha almacenado).

Condiciones de ensayo:

— fechas de realización de los estudios,

— cantidad de la sustancia de ensayo aplicada,

— disolventes utilizados y método de aplicación de la sustancia de ensayo,

— peso del suelo tratado inicialmente y muestreado a cada intervalo para su análisis,

— descripción del sistema de incubación utilizado,

— tasas de flujo de aire (solo para sistemas de flujo),

— temperatura de la configuración experimental,

— contenido de humedad del suelo durante la incubación,

— biomasa microbiana al comienzo, durante y al final de los estudios aerobios,

— pH, concentración de oxígeno y potencial redox al comienzo, durante y al final de los estudios anaerobios y de arrozal,

— método(s) de extracción,

— métodos de cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de los principales productos de transformación en el suelo y los materiales de absorción,

— número de duplicados y número de controles.

Resultados:

— resultado de la determinación de la actividad microbiana,

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,

— tasas de recuperación (en el punto 1.7.1 se dan los valores porcentuales para un estudio válido),

— cuadros de resultados expresados como porcentaje de la dosis inicial aplicada y, si procede, en $mg.kg^{-1}$ de suelo (sobre la base del peso en seco),

— balance de materia durante y al final de los estudios,

— caracterización de la radiactividad no extraíble (ligada) o los residuos en el suelo,

— cuantificación del $CO_2$ y otros compuestos volátiles liberados,

— representación gráfica de concentración en el suelo en función del tiempo de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación,

— semivida o $DT_{50}$, $DT_{75}$ y $DT_{90}$ de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación, incluyendo límites de confianza,

▼B

— estimación de la tasa de degradación abiótica en condiciones estériles,

— valoración de la cinética de transformación de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación,

— vías de transformación propuestas, si procede,

— evaluación e interpretación de los resultados,

— datos en bruto (muestras de cromatogramas, muestras de cálculos de tasas de transformación y medios utilizados para identificar los productos de transformación).

4 **REFERENCIAS**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Unión Europea (UE) (1995). Directiva 95/36/CE de la Comisión, de 14 de julio de 1995, por la que se modificà la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos Fitosanitarios. Anexo II, parte A y anexo III, parte A: Destino y comportamiento en el medio ambiente.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden — Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil — Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality — Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF — Japan 2000 — Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil — Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley — VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56,945-956 (IUPAC 1984)

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981)

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality — Sampling — Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Anexo V de la Dir. 67/548/CEE.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215-221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality — Determination of soil microbial biomass — Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45-60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16$^{th}$ Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105-120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59-63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68-69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197-200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VU, 141-146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181-199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In «Environmental Dynamics of Pesticides». R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135-172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 39, 188-204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer 33, 47-60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032-1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83-122.

▼B

*Anexo 1*

**TENSIÓN DE AGUA, CAPACIDAD DE CAMPO (FC) Y CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA (WHC)** [1]

| Altura de la columna de agua [cm] | PF [a] | bar [b] | Observaciones |
|---|---|---|---|
| 10' | 7 | $10^4$ | Suelo seco |
| 1,6 .$10^4$ | 4,2 | 16 | Punto de marchitamiento |
| $10^4$ | 4 | 10 | |
| $10^3$ | 3 | 1 | |
| 6.$10^2$ | 2,8 | 0,6 | |
| 3,3 • $10^2$ | 2,5 | 0,33 [c] | Gama de Capacidad de campo [d] |
| $10^2$ | 2 | 0,1 | |
| 60 | 1,8 | 0,06 | |
| 33 | 1,5 | 0,033 | |
| 10 | 1 | 0,01 | WHC (aproximación) |
| 1 | 0 | 0,001 | Suelo saturado de agua |

[a] pF = log de Ja altura en cm de la columna de agua.
[b] 1 bar= $10^5$ Pa.
[c] Corresponde a un contenido de agua aproximado de 10 % en arena, 35 % en suelo franco y 45 % en arcilla.
[d] La capacidad de campo no es constante, sino que varía con el tipo de suelo entre pF 1,5 y 2,5.

La *tensión de agua* se mide en cm de columna de agua o en bar. Dada la amplia gama de valores posibles, la tensión de succión se expresa sencillamente como el valor pF equivalente al logaritmo de la altura en cm de la columna de agua.

La *capacidad de campo* se define como la cantidad de agua que puede almacenar un suelo natural contra la gravedad 2 días después de un largo período de lluvia o tras una irrigación suficiente. Se determina sobre el terreno en un suelo no perturbado. Por ello, la medida no es aplicable a muestras de suelo de laboratorio perturbadas. Los valores de FC determinados en suelos perturbados pueden mostrar grandes varianzas sistemáticas.

La *capacidad de retención de agua* (WHC) se determina en el laboratorio con suelo perturbado y no perturbado mediante saturación con agua de una columna de suelo por transporte capilar. Resulta especialmente útil para suelos perturbados y puede ser hasta un 30 % superior a la capacidad de campo (1). Además, experimentalmente es más fácil determinar la WHC que valores de FC fiables.

Notas

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

*Anexo 2*

**CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUELO (g de agua por 100 g de suelo seco) DE VARIOS TIPOS DE SUELO DE DIVERSOS PAÍSES**

| Tipo de suelo | País | Contenido de humedad del suelo a | | |
|---|---|---|---|---|
| | | WHC ([1]) | pF = 1,8 | pF = 2,5 |
| Arena | Alemania | 28,7 | 8,8 | 3,9 |
| Suelo arenoso franco | Alemania | 50,4 | 17,9 | 12,1 |
| Suelo arenoso franco | Suiza | 44,0 | 35,3 | 9,2 |
| Suelo franco limoso | Suiza | 72,8 | 56,6 | 28,4 |
| Suelo franco arcilloso | Brasil | 69,7 | 38,4 | 27,3 |
| Suelo franco arcilloso | Japón | 74,4 | 57,8 | 31,4 |
| Suelo franco arenoso | Japón | 82,4 | 59,2 | 36,0 |
| Suelo franco limoso | EE.UU. | 47,2 | 33,2 | 18,8 |
| Suelo franco arenoso | EE.UU. | 40,4 | 25,2 | 13,3 |

([1]) Capacidad de retención de agua.

▼B

*Anexo 3*

*Figura 1*

**Ejemplo de aparato de flujo para estudiar la transformación de las sustancias químicas en el suelo** ([1]) ([2])

1 = Válvula de aguja

2 = Lavador de gas que contiene agua

3 = Ultramembrana (solo en condiciones estériles), tamaño de poro de 0,2 µm

4 = Frasco de metabolismo del suelo (encharcado solo para condiciones anaerobias o de arrozal)

5 = Fijador de glicol etileno para compuestos orgánicos volátiles

6 = Fijador de ácido sulfúrico para compuestos alcalinos volátiles

7, 8 = Fijador de hidróxido de sodio para $CO_2$ y compuestos ácidos volátiles

9 = Caudalímetro

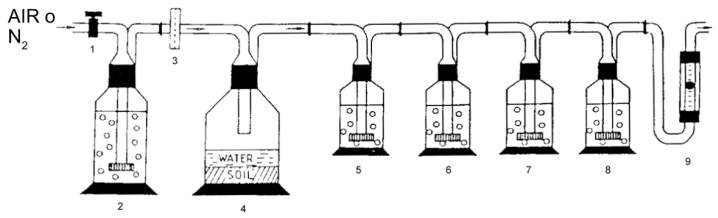
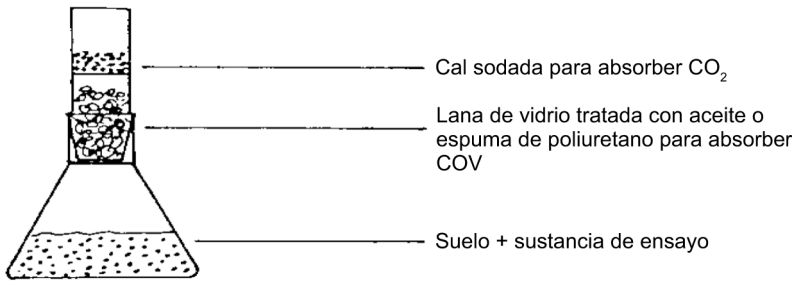



*Figura 2*

**Ejemplo de matraz biométrico para el estudio de la transformación de las sustancias químicas en el suelo** ([3])




([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soi] (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123-157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85-114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VU, 141-146.

▼B

## C.24. TRANSFORMACIÓN AEROBIA Y ANAEROBIA EN SISTEMAS DE SEDIMENTOS ACUÁTICOS

### 1. MÉTODO

El presente método reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 308 (2002).

### 1.1 INTRODUCCIÓN

Los productos químicos pueden llegar a las aguas superficiales a nivel profundo o poco profundo por vías como la aplicación directa, los aerosoles erráticos, la escorrentía, la eliminación de residuos, los efluentes domésticos o agrícolas y la deposición atmosférica. Este método de ensayo consiste en un método de laboratorio para evaluar la transformación aerobia y anaerobia de las sustancias químicas orgánicas en los sistemas de sedimentos acuáticos. El método se basa en directrices ya existentes (1)(2)(3)(4)(5)(6). En un seminario de la OCDE sobre selección de suelos y sedimentos celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (7) se alcanzó un acuerdo, en particular, sobre el número y tipos de sedimentos que deben utilizarse en este ensayo. Dicho seminario formuló asimismo recomendaciones sobre recogida, manipulación y conservación de muestras de sedimentos, basadas en la Directriz ISO correspondiente (8). Estos estudios son necesarios para las sustancias químicas que se apliquen directamente al agua o que tengan probabilidades de llegar al medio ambiente acuático por las vías mencionadas anteriormente.

Las condiciones en los sistemas de sedimentos acuáticos naturales son a menudo aerobias en la fase acuosa superior. La capa superficial del sedimento puede ser o bien aerobia o bien anaerobia, mientras que el sedimento más profundo normalmente es anaerobio. Para abarcar todas estas posibilidades, en el presente documento se describen tanto ensayos aerobios como anaerobios. El ensayo aerobio simula una columna de agua aerobia sobre una capa de sedimento aerobio a la que subyace una gradiente anaerobio. El ensayo anaerobio simula un sistema de sedimento acuático completamente anaerobio. Si las circunstancias indican que es necesario desviarse significativamente de estas recomendaciones, por ejemplo utilizando núcleos de sedimentos intactos o sedimentos que haya estado expuestos a las sustancia de ensayo, se dispone de otros métodos con este fin (9).

### 1.2 DEFINICIONES

En cualquier caso deben utilizarse unidades internacionales (Standard International (SI) units).

**Sustancia de ensayo:** cualquier sustancia, sea el compuesto original o los correspondientes productos de transformación.

**Productos de transformación:** todas las sustancias resultantes de las reacciones de transformación biótica o abiótica de la sustancia de ensayo, incluido el $CO_2$ y los residuos ligados.

**Residuos ligados:** compuestos del suelo, la planta o el animal que persisten en la matriz en forma de sustancia original o de sus productos de transformación/metabolitos tras la extracción. El método de extracción no debe modificar sustancialmente ni los propios compuestos ni la estructura de la matriz. La naturaleza del vínculo puede aclararse parcialmente mediante métodos de extracción que alteren la matriz y técnicas analíticas sofisticadas. Así por ejemplo, hasta la fecha se han identificado de esta manera enlaces covalentes, iónicos y de sorción, así como atrapamientos. En general, la formación de residuos ligados reduce de manera significativa la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad (10) [modificado de TUPAC 1984 (11)].

▼B

**Transformación aerobia:** (oxidación) reacciones que se producen en presencia de oxígeno molecular (12).

**Transformación anaerobia:** (reducción) reacciones que se producen en ausencia de oxígeno molecular (12).

**Aguas naturales:** aguas superficiales obtenidas de estanques, ríos, arroyos, etc.

**Sedimento:** mezcla de constituyentes químicos minerales y orgánicos; estos últimos contienen compuestos de elevado contenido en carbono y en nitrógeno y de peso molecular elevado. El sedimento es depositado por las aguas naturales y forma una interfaz con el agua.

**Mineralización:** degradación completa de un compuesto orgánico a $CO_2$ y $H_2O$ en condiciones aerobias y a $CH_4$, $CO_2$ y $H_2O$ en condiciones anaerobias. En el contexto del presente método, cuando se utiliza un compuesto radiomarcado, mineralización significa la amplia degradación de una molécula durante la cual se oxida un átomo de carbono marcado o se reduce cuantitativamente con liberación de la cantidad apropiada de $^{14}CO_2$ o $^{14}CH_4$, respectivamente.

**Semivida:** $t_{0,5}$, es el tiempo que tarda la transformación del 50 % de una sustancia de ensayo cuando puede describirse dicha transformación mediante una cinética de primer orden; es independiente de la concentración inicial.

**$DT_{50}$ (tiempo de desaparición SO):** es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 50 %.

**$DT_{75}$ (tiempo de desaparición 75):** es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 75 %.

**$DT_{90}$ (tiempo de desaparición 90):** es el tiempo que tarda la concentración inicial de la sustancia de ensayo en reducirse en un 90 %.

1.3 COMPUESTOS DE REFERENCIA

Deben utilizarse sustancias de referencia para la cuantificación e identificación de los productos de transformación por métodos espectroscópicos o cromatográficos.

1.4 INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA DE ENSAYO

Para medir la tasa de transformación podrá utilizarse una sustancia de ensayo no marcada o marcada con un isótopo, aunque se prefiere el material marcado. Para estudiar la vía de transformación y establecer un balance de materia se requiere material marcado. Se recomienda el marcado con $^{14}C$, pero también puede resultar de utilidad el uso de otros isótopos, tales como $^{13}C$, $^{15}N$, $^{3}H$ o $^{32}P$. El marcador deberá ubicarse, en la medida de lo posible, en la parte o las partes más estables de la molécula ([1]). La pureza química y/o radioquímica de la sustancia de ensayo debe ser de al menos el 95 %.

Antes de llevar a cabo el ensayo, debe disponerse de la información siguiente sobre la sustancia de ensayo:

a) solubilidad en agua (Método A.6);

b) solubilidad en disolventes orgánicos;

c) presión de vapor (Método A.4) y constante de la ley de Henry;

([1]) Por ejemplo, si la sustancia de ensayo contiene un anillo, es preciso marcar ese anillo: si contiene dos o más anillos, puede resultar necesario efectuar estudios separados para evaluar el destino de cada anillo marcado y obtener información adecuada sobre la formación de los productos de transformación.

▼B

d) coeficiente de reparto n-octanol/agua (Método A.8);

e) coeficiente de adsorción ($K_d$, Kf o $K_{oc}$, en su caso) (Método C. 18);

f) hidrólisis (Método C.7);

g) constante de disociación ($pK_a$) [Directriz OECD 112] (13);

h) estructura química de la sustancia de ensayo y posición de la marca o marcas isotópicas, en su caso.

*Nota:* Debe indicarse la temperatura a la que se hicieron estas mediciones.

Además, puede incluirse otra información de utilidad como datos sobre la toxicidad de la sustancia de ensayo para los microorganismos, sobre la biodegrabilidad inherente o inmediata, y sobre la transformación aerobia y anaerobia en el suelo.

Debe contarse con métodos analíticos (incluidos métodos de extracción y depuración) para la cuantificación e identificación de la sustancia de ensayo y de sus productos de transformación en el agua y los sedimentos (véase el punto 1.7.2).

1.5 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

El método descrito en este ensayo emplea un sistema de sedimento acuático aerobio y anaerobio (véase el anexo 1) que permite:

i) la medición de la tasa de transformación de la sustancia de ensayo en un sistema de sedimento-agua,

ii) la medición de la tasa de transformación de la sustancia de ensayo en el sedimento,

iii) la medición de la tasa de mineralización de la sustancia de ensayo y/o sus productos de transformación (cuando se utiliza una sustancia de ensayo marcada con $^{14}C$),

iv) la identificación y cuantificación de los productos de transformación en las fases acuática y de sedimentaria incluido el balance de materia (cuando se utilice una sustancia de ensayo marcada),

v) la medición de la distribución de la sustancia de ensayo y sus productos de transformación entre las dos fases durante un período de incubación en la oscuridad (para evitar, por ejemplo, floraciones de algas) a temperatura constante; las semividas y los valores DT50, DT75 y $DT_{90}$ se determinarán cuando los datos lo permitan, pero no deben extrapolarse mucho más allá del período experimental (véase el punto 1.2).

Se requieren al menos dos sedimentos y sus aguas asociadas para cada uno de los estudios aerobio y anaerobio (7). Sin embargo, puede haber casos en los que se usen más de dos sedimentos acuáticos, por ejemplo, para una sustancia química que pueda estar presente en entornos de aguas dulces y/o marinas.

▼B

1.6 APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El método es aplicable en general a todas las sustancias químicas (no marcadas o marcadas) para las que se disponga de un método analítico de suficiente exactitud y sensibilidad. Es aplicable a compuestos ligeramente volátiles, no volátiles, solubles en agua o poco solubles en agua. El ensayo no deberá aplicarse a sustancias químicas que sean muy volátiles a partir del agua (por ejemplo, fumigantes o disolventes orgánicos) y, por tanto, no se puedan mantener en el agua y/o el sedimento en las condiciones experimentales del presente ensayo.

Este método se ha aplicado hasta ahora para estudiar la transformación de sustancias químicas en aguas dulces y sedimentos, pero, en principio, se puede aplicar también a sistemas marinos/de estuarios. No es adecuado para simular las condiciones de aguas corrientes (por ejemplo, ríos) o el mar abierto.

1.7 CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1 **Recuperación**

La extracción y el análisis de muestras de agua y sedimento, cuando menos duplicadas, inmediatamente después de la adición de la sustancia de ensayo dan una primera indicación de la repetibilidad del método analítico y de la uniformidad del procedimiento de aplicación de la sustancia de ensayo. Los valores de recuperación para fases posteriores del experimento los dan los balances de materia respectivos (cuando se utiliza material marcado). Dichos valores deben situarse entre el 90 % y el 110 % para sustancias químicas marcadas (6) y entre el 70 % y el 110 % para sustancias químicas no marcadas.

1.7.2 **Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

La repetibilidad del método analítico (excluida la eficiencia de extracción inicial) para cuantificar la sustancia de ensayo y los productos de transformación puede comprobarse realizando un análisis por duplicado del mismo extracto de las muestras de agua o sedimento que fueron incubadas durante tiempo suficiente para que se formaran productos de transformación.

El límite de detección (LOD) del método analítico de la sustancia de ensayo y de los productos de transformación debe alcanzar, como mínimo, el menor de los siguientes valores: 0,01 $mg.kg^{-1}$ de agua o sedimento (como sustancia de ensayo) o un 1 % de la cantidad inicial aplicada a un sistema de ensayo. También debe especificarse el límite de cuantificación (LOQ).

1.7.3 **Exactitud de los datos de transformación**

El análisis de regresión de las concentraciones de la sustancia de ensayo en función del tiempo facilita la información apropiada sobre la fiabilidad de la curva de transformación y permite calcular los límites de confianza de las semividas (en el caso de la cinética de pseudo primer orden) o los valores $DT_{50}$ y, si procede, $DT_{75}$ y $DT_{90}$.

1.8 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1.8.1 **Sistema de ensayo y equipo**

El estudio debe hacerse en recipientes de vidrio (por ejemplo, frascos, tubos de centrifugación), a menos que se disponga de información preliminar (como el coeficiente de reparto n-octanol/agua, datos sobre adsorción, etc.) que indiquen que la sustancia de ensayo puede adherirse al vidrio, en este caso tendrá que estudiarse la posibilidad de emplear un material alternativo (como Teflon). Cuando se sepa que la sustancia de ensayo se adhiere al vidrio, podrá paliarse el problema recurriendo a uno o varios de los métodos siguientes:

▼B

— determinar la masa de la sustancia de ensayo y los productos de transformación que adsorbe el vidrio,

— hacer un lavado con disolvente de todos los recipientes de vidrio al final del ensayo,

— utilizar productos formulados (véase también el punto 1.9.2),

— utilizar una cantidad mayor de co-disolvente para añadir la sustancia de ensayo al sistema; si se emplea un co-disolvente debe tratarse de uno que no solvate la sustancia de ensayo.

En los anexos 2 y 3, respectivamente, se muestran ejemplos de aparatos de ensayo habituales, por ejemplo, sistemas de flujo de gas y biométricos (14). En la referencia 15 se describen otros sistemas útiles de incubación. El diseño del aparato experimental debe permitir el intercambio de aire o nitrógeno y la fijación de los productos volátiles. Las dimensiones del aparato deben ser tales que se cumplan los requisitos del ensayo (véase el punto 1.9.1). Podrá ventilarse o bien mediante un burbujeo suave o bien haciendo pasar aire o nitrógeno sobre la superficie del agua. En este último caso puede ser aconsejable agitar suavemente el agua desde arriba para una mejor distribución del oxígeno o el nitrógeno en esta. No debe usarse aire sin $CO_2$ ya que puede aumentar el pH del agua. En cualquiera de los dos casos, no es conveniente remover el sedimento, cosa que debe evitarse todo lo posible. Las sustancias químicas ligeramente volátiles deben ensayarse en sistema biométrico con una agitación suave de la superficie del agua. También pueden utilizarse recipiente cerrados con un espacio libre o bien de aire atmosférico o bien de nitrógeno y frascos internos para la fijación de productos volátiles (16). En el ensayo aerobio se requiere un intercambio regular del gas del espacio libre a fin de compensar el consumo de oxígeno de la biomasa.

Entre los fijadores adecuados para recoger productos de transformación volátiles cabe citar, de manera no exhaustiva, las soluciones $1 mol.dm^{-3}$ de hidróxido de potasio o hidróxido de sodio para el dióxido de carbono ([1]) y el etileno glicol, la etanolamina o la parafina al 2 % en xileno para los compuestos orgánicos. Los compuestos volátiles formados en condiciones anaerobias, como el metano, pueden recogerse, por ejemplo, mediante tamices moleculares. Estos compuestos volátiles pueden convertirse, por ejemplo, en $CO_2$ por combustión haciendo pasar el gas por un tubo de cuarzo lleno de CuO a una temperatura de 900 $^{o}C$ y captando el $CO_2$ formado en un absorbedor con una base (17).

Se requiere un equipo de laboratorio para el análisis químico de la sustancia de ensayo y los productos de transformación (por ejemplo, cromatografía líquida de gases (GLC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC), espectroscopia de masas (MS), cromatografía de gases-espectroscopia de masas (GC-MS), espectrometría de masas-cromatografía líquida (LC-MS), resonancia magnética nuclear (RMN), etc.), incluidos sistemas de detección para sustancias químicas radiomarcadas o no radiomarcadas, según corresponda. Cuando se utilice material radiomarcado se necesitará también un contador de centelleo de líquidos y una cámara de combustión oxidante (para la combustión de muestras de sedimento antes del análisis de radiactividad).

Además se necesitará, según corresponda, otro equipo de laboratorio estándar para análisis fisicoquímicos y biológicos (véase el cuadro 1, punto 1.8.2.2), así como recipientes de vidrio, sustancias químicas y reactivos.

([1]) Como estas soluciones de absorción alcalinas absorben también el dióxido de carbono del aire de la ventilación y el formado por la respiración en los experimentos aerobios, tienen que cambiarse a intervalos regulares para evitar su saturación y, así, la pérdida de su capacidad de absorción.

▼B

1.8.2 **Selección y número de sedimentos acuáticos**

Los lugares donde se tomen las muestras deberán seleccionarse con arreglo a la finalidad del ensayo en cualquier situación dada. Al seleccionar los lugares donde se tomen las muestras, se tendrá en cuenta su historia en cuanto a posibles aportaciones de origen agrícola, industrial o doméstico a la cuenca o los ríos o arroyos aguas arriba. No deben usarse sedimentos si han sido contaminados con la sustancia de ensayo o sus análogos estructurales durante los 4 años anteriores.

1.8.2.1 *Selección de sedimentos*

Para los estudios aerobios se utilizarán normalmente dos sedimentos (7). Los dos sedimentos seleccionados tienen que ser distintos en cuanto a contenido de carbono orgánico y textura. Un sedimento ha de tener un elevado contenido de carbono orgánico (2,5 - 7,5 %) y una textura fina, y el otro, un bajo contenido de carbono orgánico (0,5 - 2,5 %) y una textura gruesa. La diferencia en cuanto al contenido de carbono orgánico debe ser normalmente, al menos, del 2 %. Se entiende por «textura fina» un contenido de [arcilla+limo] ([1]) >50 % y por «textura gruesa», un contenido de [arcilla+limo] de <50 %. La diferencia en cuanto al contenido de [arcilla+limo] debe ser normalmente, al menos, del 20 %. En los casos en que una sustancia química pueda llegar también a las aguas marinas, al menos uno de los sistemas de sedimentos acuáticos deberá ser de origen marino.

Para el estudio estrictamente anaerobio, deben tomarse muestras de dos sedimentos (incluidas sus aguas asociadas) de las zonas anaerobias de las masas de agua superficiales (7). Tanto el sedimento como las fases acuáticas tienen que manejarse y transportarse cuidadosamente en condiciones de exclusión de oxígeno.

Puede haber otros parámetros que sean importantes para la selección de los sedimentos y que deban considerarse caso por caso. Por ejemplo, el pH de los sedimentos sería importante para ensayar sustancias químicas cuando su transformación y/o adsorción pueda depender de este. La dependencia de la adsorción con respecto al pH podría venir dada por la $pK_a$ de la sustancia de ensayo.

1.8.2.2 *Caracterización de las muestras sedimento-agua*

En el cuadro a continuación se resumen los parámetros clave que deben medirse e indicarse (con referencia al método utilizado) tanto para el agua como para el sedimento, y la fase del ensayo en la que deben determinarse. En la bilbiografía, referencias (18)(19)(20) y (21), se dan, a título informativo, los métodos de determinación de estos parámetros.

Además, puede ser necesario medir e indicar caso por caso otros parámetros (por ejemplo, para las aguas dulces: partículas, alcalinidad, dureza, conductividad y $NO_3/PO_4$ (proporción y valores de cada compuesto); para los sedimentos: capacidad de intercambio de cationes, capacidad de retención de agua, carbonates, fósforo y nitrógeno totales; y para los sistemas marinos: salinidad. El análisis de los sedimentos y el agua para detectar nitratos, sulfatos, hierro biodisponible y posiblemente otros aceptadores de electrones puede ser útil también al valorar las condiciones redox, especialmente en relación con la transformación anaerobia.

([1]) [Arcilla+limo] es la fracción mineral del sedimento con un tamaño de partícula < 50 μm.

▼B

**Medición de parámetros para la caracterización de las muestras agua-sedimentos (7)(22)(23)**

| Parametro | Fase del procedimiento de ensayo | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | muestreo in situ | manejo posterior | inicio de la aclimata-ción | al inicio del ensayo | durante el ensayo | al final del ensayo |
| **Agua** | | | | | | |
| Origen/fuente | x | | | | | |
| Temperatura | x | | | | | |
| pH* | x | | x | x | x | x |
| COT | | | x | x | | x |
| Concentración de $O_2$* | x | | x | x | x | x |
| Potencial redox* | | | x | x | x | x |
| **Sedimento** | | | | | | |
| Origen/fuente | x | | | | | |
| Profundidad de la capa | x | | | | | |
| pH (*) | | x | x | x | x | x |
| Distribución del tamaño de las partículas | | x | | | | |
| COT | | x | x | x | | x |
| Biomasa microbiana (**) | | x | | x | | x |
| Potencial redox (*) | Observación (color/olor) | | x | x | x | x |

(*) Los resultados de investigaciones recientes han mostrado que las mediciones de las concentraciones de oxígeno en el agua y los potenciales redox no tienen un valor mecáno ni predictivo on lo que se refiere al crecimiento y desarrollo de poblaciones microbianas en aguas superficiales (24)(25). La determinacíon de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO en la toma de muestras, el inicio y el final del ensayo) y de las concentraciones de *los micro/macronutrientes* Ca, Mg y Mn (al inicio y al final del ensayo) en el agua, y la medición de N y el P totales en los sedimentos (en la toma de muestras y al final del ensayo) pueden ser instrumentos mejores para interpretar y evaluar las tasas y las vías de biotransformación aerobia.

(**) Método de la tasa de respiración microbiana (26), método de la fumigación (27) o mediciones de recuento en placas (por ejemplo, bacterias, actinomicetos, hongos y colonias totales) para estudios anaerobios; tasa de metanogénesis para estudios anaerobios

1.8.3 **Recogida, manejo y almacenamiento**

1.8.3.1 *Recogida*

Para la toma de muestras de sedimentos, deberá utilizarse el proyecto de Directriz ISO sobre la toma de muestras de sedimentos de fondo (8). Las muestras de sedimento se tomarán de toda la capa superior de 5 a 10 cm del sedimento. El agua asociada debe recogerse del mismo lugar y al mismo tiempo que el sedimento. Para el estudio anaerobio, las muestras de sedimento y agua asociada deben tomarse en condiciones de exclusión de oxígeno (28) (véase el punto 1.8.2.1). En la bibliografía se describen algunos aparatos de toma de muestras (8) (23).

▼B

1.8.3.2 *Manejo*

El sedimento se separa del agua por filtración y se tamiza por va húmeda a través de una criba de 2 mm utilizando el agua del lugar de recogida sobrante que luego se tira. A continuación, las cantidades conocidas de sedimentos y agua se mezclan en la proporción deseada (véase el punto 1.9.1) en los recipientes de incubación y se preparan para el período de aclimatación (véase el punto 1.8.4). Para el estudio anaerobio, todas las etapas del manejo tiene que llevarse a cabo en condiciones de exclusión de oxígeno (29) (30) (31) (32) y (33).

1.8.3.3 *Almacenamiento*

Se recomienda encarecidamente utilizar sedimentos y agua recién recogidos, pero, si es necesario el almacenamiento, el sedimento y el agua tiene que tamizarse como se ha descrito anteriormente y almacenarse juntos, empapados en agua (en una capa de agua de 6-10 cm), en la oscuridad y a 4 ± 2 $^{o}C$[4] durante un máximo de 4 semanas (7) (8) (23). Las muestras utilizadas par estudios aerobios tienen que almacenarse de manera que el aire pueda acceder libremente (por ejemplo, en recipientes abiertos), mientras que las de estudios anaerobios tiene que estar en condiciones de exclusión de oxígeno. No debe haber congelación del sedimento y el agua ni secado del sedimento durante el transporte y el almacenamiento.

1.8.4 **Preparación de las muestras de sedimento/agua para el ensayo**

Tiene que haber un período de aclimatación antes de añadir la sustancia de ensayo, teniendo en cuenta que cada muestra de sedimento/agua ha de colocarse en el recipiente de incubación que se vaya a usar en el ensayo principal, y que la aclimatación ha de llevarse a cabo exactamente en las mismas condiciones que la incubación para el ensayo (véase el punto 1.9.1). El período de aclimatación es el tiempo necesario para alcanzar una estabilidad razonable del sistema, expresada mediante el pH, la concentración de oxígeno en el agua, el potencial redox del sedimento y el agua, y la separación macroscópica de las fases. El período de aclimatación debe durar normalmente entre una y dos semanas y no debe superar las cuatro semanas. Se indicarán los resultados de las determinaciones efectuadas durante este período.

1.9 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

1.9.1 **Condiciones del ensayo**

El ensayo deberá hacerse en el aparato de incubación (véase el punto 1.8.1) con una proporción agua/sedimento en volumen entre 3:1 y 4:1, y urta capa de sedimento de 2,5 cm (± 0,5 cm). Se recomienda una cantidad mínima de sedimento de 50 g (en peso seco) por recipiente de incubación.

El ensayo se hará en la oscuridad a una temperatura constante dentro de un intervalo de 10 a 30 $^{o}C$. Se considera apropiada una temperatura de 20 ± 2 $^{o}C$. En su caso, podría considerarse otra temperatura más baja (por ejemplo, 10 $^{o}C$) en determinados casos concretos, según la información que desee obtenerse del ensayo. Deberá controlarse e indicarse la temperatura de incubación.

▼B

1.9.2 **Tratamiento y aplicación de la sustancia de ensayo**

Se utilizará una única concentración para el ensayo. Para productos fitosanitarios aplicados directamente a las masas de agua, la dosificación máxima indicada en la etiqueta debe tomarse como la tasa de aplicación máxima calculada basándose en la superficie del agua en el recipiente de ensayo. En todos los demás casos, la concentración que ha de emplearse tiene que basarse en las previsiones de emisiones medioambientales. Se procurará aplicar una concentración adecuada de la sustancia de ensayo a fin de caracterizar la vía de transformación y la formación y la desaparición de productos de transformación. Puede resultar necesario aplicar dosis superiores (por ejemplo, 10 veces más) cuando las concentraciones de la sustancia de ensayo estén próximas a los límites de detección al inicio del estudio y/o cuando no puedan detectarse fácilmente productos de transformación importantes que estén presentes al 10 % de la tasa de aplicación de la sustancia de ensayo. Sin embargo, si se usan concentraciones de ensayo más altas, no deberán tener un efecto perjudicial significativo en la actividad microbiana del sistema sedimento-agua. Para conseguir una concentración constante de la sustancia de ensayo en recipientes de diferentes dimensiones puede considerarse adecuado un ajuste según la cantidad del material aplicado, basándose en la altura de la columna de agua en el recipiente en relación con la profundidad del agua en el campo (que se supone que es 100 cm, aunque pueden utilizarse otras alturas). En el anexo 4 se da un ejemplo de cálculo.

El procedimiento ideal es aplicar la sustancia de ensayo como una solución acuosa en la fase acuosa del sistema de ensayo. Si es inevitable, se permite el uso de cantidades pequeñas de disolventes miscibles con agua (como la acetona y el etanol) para la aplicación y distribución de la sustancia de ensayo, pero estas cantidades no deben superar el 1 % v/v ni tener efectos perjudiciales para la actividad microbiana del sistema de ensayo. Debe procederse con cuidado al generar la solución acuosa de la sustancia de ensayo: puede resultar necesario utilizar aparatos de columnas y pre-mezclado para asegurar una homogeneidad completa. Tras añadir la solución acuosa al sistema de ensayo, se recomienda mezclar suavemente la fase acuosa, removiendo el sedimento lo menos posible.

No se recomienda por lo general el uso de productos formulados ya que los ingredientes de la fórmula pueden afectar a la distribución de la sustancia de ensayo y/o los productos de transformación entre las fases acuosa y sedimentaria. No obstante, en el caso de sustancias de ensayo poco solubles en agua, su utilización puede constituir una alternativa apropiada.

El número de recipientes de incubación depende del número de tiempos de muestreo (véase el punto 1.9.3). Debe incluirse un número suficiente de sistemas de ensayo de manera que puedan sacrificarse dos sistemas en cada tiempo de muestreo. Cuando se empleen unidades de control de cada sistema de sedimento acuático, estas no deben tratarse con la sustancia de ensayo. Las unidades de control pueden utilizarse para determinar la biomasa microbiana del sedimento y el carbono orgánico total del agua y del sedimento al final del estudio. Dos de las unidades de control (es decir, una unidad de control de cada sedimento acuático) pueden utilizarse para controlar los parámetros requeridos en el sedimento y el agua durante el período de aclimatación (véase el cuadro del punto 1.8.2.2). Hay que incluir dos unidades de control adicionales en caso de que la sustancia de ensayo se aplique mediante un disolvente para medir los efectos negativos del sistema de ensayo en la actividad microbiana.

▼B

1.9.3 **Duración del ensayo y muestreo**

La duración del experimento no superará normalmente los 100 días (6). El experimento ha de continuar hasta que queden establecidas la vía de degradación y el modelo de distribución sedimento/agua o cuando el 90 % de la sustancia de ensayo se haya disipado por transformación y/o volatilización. El número de tiempos de muestreo debe ser seis, como mínimo, (incluido el tiempo 0), teniendo en cuenta que deberá hacerse un estudio opcional preliminar (véase el punto 1.9.4) para establecer un régimen de muestreo adecuado y la duración del ensayo, a menos que se disponga de datos suficientes sobre la sustancia de ensayo a partir de estudios previos. Para las sustancias de ensayo hidrofóbicas, puede ser necesaria la inclusión de otros puntos de muestreo durante el período inicial del estudio a fin de determinar la tasa de distribución entre las fases acuosa y sedimentaria.

Puede ser útil un ensayo con una segunda concentración para sustancias químicas que lleguen a las aguas superficiales por diferentes vías de entrada en concentraciones significativamente diferentes, siempre que la concentración más baja pueda analizarse con suficiente exactitud. A los tiempos de muestreo adecuados, se separan los recipientes de incubación completos (copias) para su análisis. Se analizan por separado el sedimento y el agua que sobrenada ([1]). El agua superficial tiene que separarse con cuidado procurando remover el sedimento lo menos posible. La extracción y caracterización de la sustancia de ensayo y los productos de transformación deben hacerse conforme a procedimientos analíticos adecuados. Se pondrá cuidado en separar el material que pueda haber sido adsorbido en el recipiente de incubación o los tubos de interconexión utilizados para atrapar sustancias volátiles.

1.9.4 **Ensayo preliminar opcional**

Si no puede calcularse la duración ni el régimen de muestreo a partir de otros estudios sobre la sustancia de ensayo, puede resultar adecuado un ensayo preliminar opcional, que debe hacerse en las mismas condiciones de ensayo propuestas para el estudio definitivo. Si se lleva a cabo el ensayo preliminar, se informará brevemente sobre sus condiciones experimentales y sus resultados.

1.9.5 **Mediciones y análisis**

Se medirá y se indicará la concentración de la sustancia de ensayo y los productos de transformación en cada tiempo de muestreo en el agua y el sedimento (como, concentración y como porcentaje de la sustancia aplicada). En general, deberán identificarse los productos de transformación detectados a >10 % de la radiactividad aplicada en todo el sistema agua-sedimento en cualquier tiempo de muestreo, a no ser que esté razonablemente justificado no hacerlo. Habrá de tomarse en consideración la identificación de los productos de transformación cuyas concentraciones aumenten continuamente durante el estudio, aunque las concentraciones no superen los límites indicados anteriormente, ya que este aumento puede indicar persistencia. Este aspecto se considerará caso por caso, justificándolo debidamente en el informe.

Los resultados de los sistemas de fijación de gases/sustancias volátiles ($CO_2$ y otros, por ejemplo, compuestos orgánicos volátiles) deberán indicarse en cada tiempo de muestreo. Se indicarán las tasas de mineralización. Asimismo, se indicarán los residuos no extraíbles (ligados) en el sedimento en cada punto de muestreo.

([1]) Cuando pueda darse fácilmente una reoxidación rápida de los productos de la transformación anaerobia, se mantendrán las condiciones anaerobias durante el muestreo y el análisis.

▼B

## 2 RESULTADOS

### 2.1 TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

En cada tiempo de muestreo se calculará el balance total de materia o la recuperación (véase el punto 1.7.1) de la radiactividad añadida. Los resultados deberán indicarse en porcentaje de la radiactividad añadida. La distribución de la radiactividad entre el agua y el sedimento se expresará en concentraciones y porcentajes en cada tiempo de muestreo.

La semivida, el $DT_{50}$ y, en su caso, el $DT_{75}$ y el $DT_{90}$ deberán calcularse junto con sus límites de confianza (véase el punto 1.7.3) Podrá obtenerse información sobre la tasa de disipación de la sustancia de ensayo en el agua y el sedimento mediante el uso de instrumentos de evaluación adecuados. Estos instrumentos pueden ir desde la aplicación de cinética de pseudo primer orden a técnicas empíricas de ajuste de curvas con soluciones gráficas o numéricas y evaluaciones más complejas utilizando; por ejemplo, modelos unicompartimentales o multicompartimentales. Para más información puede consultarse la bibliografía correspondiente (35) (36) (37).

Todos los planteamientos al respecto tienen sus ventajas e inconvenientes y varían considerablemente en cuanto a complejidad. El supuesto de una cinética de primer orden puede ser una simplificación excesiva de los procesos de degradación y distribución, pero, cuando es posible, da un término (constante de velocidad o semivida) que es fácilmente comprensible y valioso en la modelización por simulación y en los cálculos de las concentraciones previstas en el medio ambiente. Los planteamientos empíricos o las transformaciones lineales pueden dar lugar a un mejor ajuste de las curvas a los datos y, por tanto, permitir una mejor estimación de las semividas, los valores $DT_{50}$ y, en su caso, los $DT_{75}$ y $DT_{90}$. Sin embargo, el uso de las constantes derivadas es limitado. Los modelos compartimentales pueden generar una serie de constantes de valor útiles en la evaluación de riesgos que describen la velocidad de degradación en diferentes compartimentos y la distribución de la sustancia química. Asimismo, estos modelos deben utilizarse para el cálculo de constantes de velocidad en la formación y degradación de los principales productos de transformación. En todos los casos, el método elegido debe justificarse y el experimentador ha de demostrar gráfica o estadísticamente la corrección del ajuste.

## 3 INFORME

### 3.1 INFORME DEL ENSAYO

El informe debe comprender la siguiente información:

Sustancia de ensayo:

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural (indicando la posición del marcador cuando se usa material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas de interés,

— pureza (impurezas) de la sustancia de ensayo,

— pureza radioquímica de la sustancia química marcada y actividad molar (si procede).

▼B

Sustancias de referencia:

— nombre químico y estructura de las sustancias de referencia utilizadas para caracterizar y/o identificar los productos de transformación.

Sedimentos y aguas del ensayo:

— ubicación y descripción de los lugares donde se han tomado las muestras de sedimentos acuáticos incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación,

— toda la información sobre la recogida, almacenamiento (si lo hay) y aclimatación de los sistemas agua- sedimento,

— características de las muestras agua-sedimento según lo indicado en el cuadro del punto 1.8.2.2.

Condiciones de ensayo:

— sistema de ensayo utilizado (por ejemplo, sistema de flujo, sistema biométrico, forma de ventilación, método de agitado, volumen de agua, masa del sedimento, grosor de la capa de sedimento y agua, dimensión del recipiente de prueba, etc.),

— aplicación de la sustancia de ensayo al sistema de ensayo: concentración de ensayo utilizada, número de copias y testigos, forma de aplicación de la sustancia de ensayo (por ejemplo, utilización de disolventes, en su caso) etc.,

— temperatura de incubación,

— tiempos de muestreo,

— métodos de extracción y sus rendimientos, así como métodos analíticos y límites de detección,

— métodos de caracterización/identificación de productos de transformación,

— desviaciones del protocolo de ensayo o de las condiciones de ensayo durante el estudio.

Resultados:

— cifras en bruto de los análisis representativos (todos los datos en bruto tienen que almacenarse en el archivo BPL),

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos analíticos utilizados,

— tasas de recuperación (en el punto 1.7.1 se dan los valores porcentuales para un estudio válido),

— tablas de resultados expresada en % de la dosis aplicada y en $mg.kg^{-1}$ en el agua, el sedimento y el sistema completo (solo %) para la sustancia de ensayo y, si procede, para los productos de transformación y la radiactividad no extraíble,

— balance de materia durante y al final de los estudios,

— representación gráfica de la transformación en las fracciones acuosa y sedimentaria y en el sistema completo (incluida la mineralización),

— tasas de mineralización,

▼B

— semivida, DT50, y, en su caso, $DT_{75}$ y $DT_{90}$ de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación, incluyendo límites de confianza en el agua, el sedimento y el sistema completo,

— valoración de la cinética de transformación de la sustancia de ensayo y, si procede, de los principales productos de transformación,

— vía de transformación propuesta, si procede,

— discusión de los resultados.

**REFERENCIAS**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) — Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35-37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18-20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality — Sampling — Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994-2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC — Pests and Diseases, 3B-4, 149-158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85-114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631-637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with $^{14}$C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661-667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17$^{th}$ edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038-1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop «A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests», 3-4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8-10 November 1993.Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858-2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on micTobial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329-338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197-203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality — Determination of soil microbial biomass — Part 2: Fumigation-extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13-21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850-857.

(30) Birch, R.R., Biver, G, Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527-1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499-1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of $^{14}C$-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597-3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961-968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 39, 187-203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz — Nachrichten Bayer, 33, 47-60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference — Pest and Diseases, pp 1349-1354.

▼B

*Anexo 1*

## DIRECTRIZ SOBRE LOS SISTEMAS DE ENSAYO AEROBIOS Y ANAEROBIOS

**Sistema de ensayo aerobio**

El sistema de ensayo aerobio descrito en este método de ensayo consiste en una capa de agua aerobia (cuyas concentraciones de oxígeno oscilan normalmente entre 7 y 10 mg l-1) y una capa de sedimento, aerobio en la superficie y anaerobio por debajo de la superficie (cuyos potenciales redox medios (Eh) oscilan normalmente en la zona anaerobia del sedimento entre - 80 y - 190 mV). Se hará circular aire húmedo sobre la superficie del agua en cada unidad de incubación para mantener suficiente oxígeno en el espacio libre.

**Sistema de ensayo anaerobio**

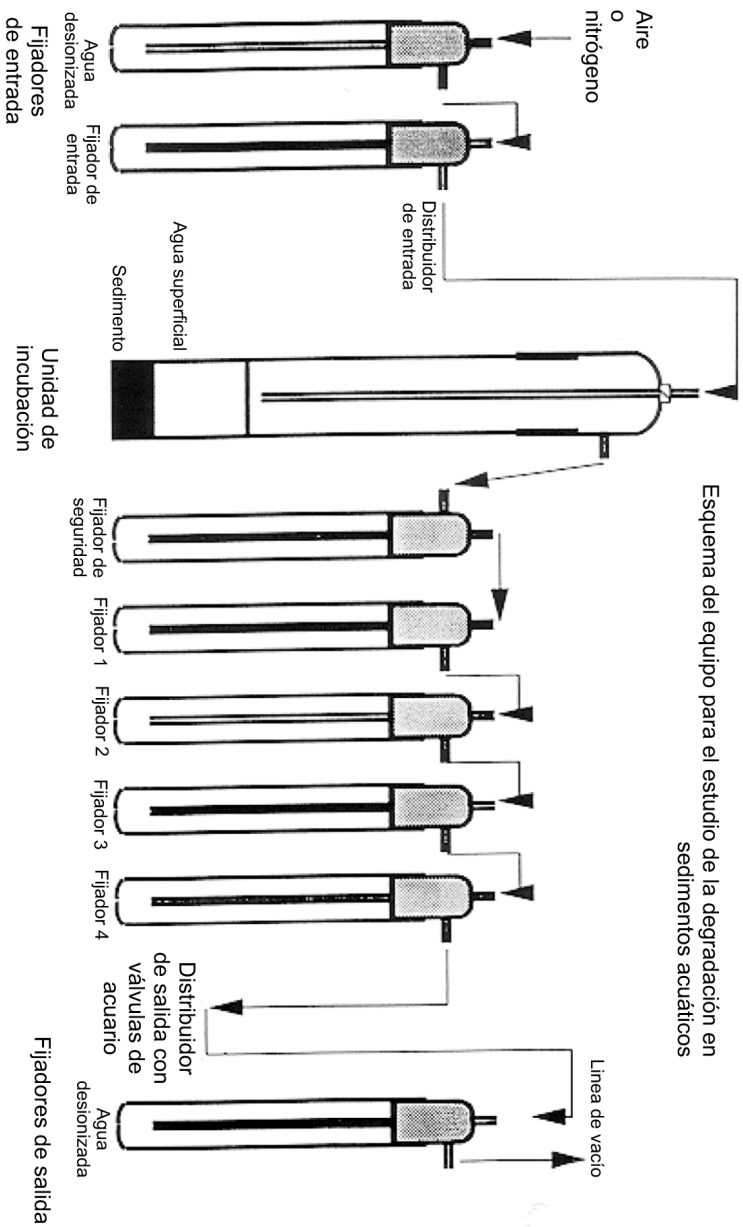
Para el sistema de ensayo anaerobio, el procedimiento del ensayo es esencialmente el mismo que el descrito para el sistema aerobio con la excepción de que el nitrógeno humedecido se pasa por la superficie del agua en cada unidad de incubación para mantener un espacio libre de nitrógeno. El sedimento y el agua se consideran anaerobios cuando el potencial redox (Eh) sea inferior a - 100 mV.

En el ensayo anaerobio, la valoración de la mineralización incluye la medición del dióxido de carbono y el metano liberados.

▼B

*Anexo 2*

**EJEMPLO DE APARATO DE RUJO**

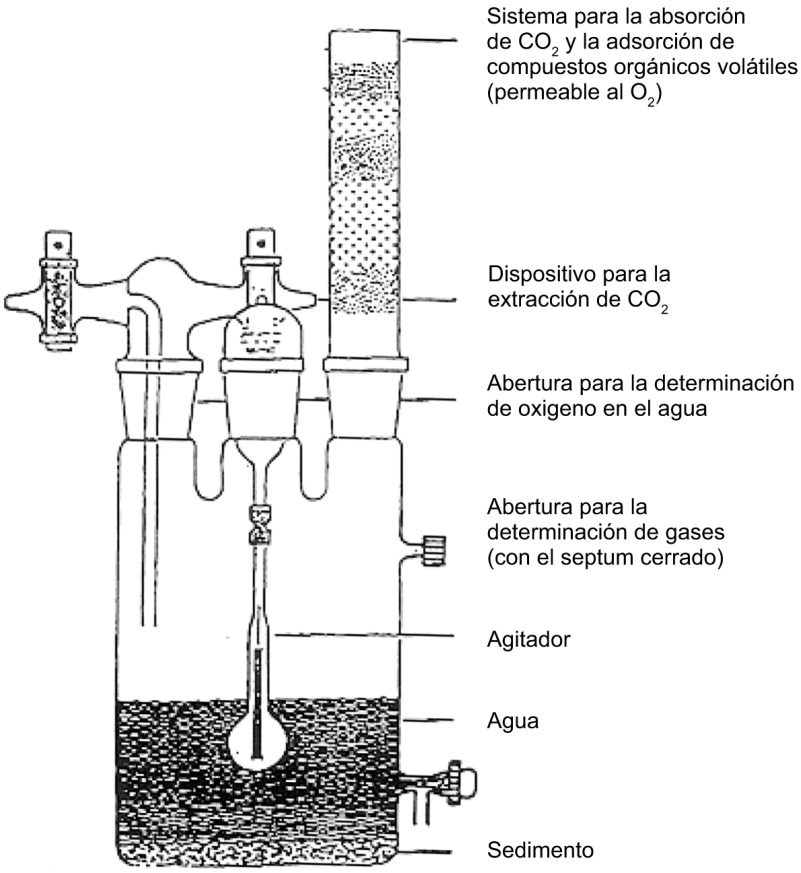



Fijador de seguridad vacío
Fijador 1:
etileno glicol para la fijación de compuestos orgánicos volátiles
Fijador 2:
ácido sulfúrico 0,1 M para la fijación de compuestos volátiles alcalinos
Fijadors 3 y 4:
hidróxido de sodio 2M para la fijación de $CO_2$ y otros compuestos volátiles ácidos

▼B

*Anexo 3*

**EJEMPLO DE APARATO BIOMÉTRICO**



▼B

*Anexo 4*

**EJEMPLO DE CÁLCULO DE LA DOSIS QUE DEBE APLICARSE A LOS RECIPIENTES DE ENSAYO**

| | |
|---|---|
| Diámetro interno del cilindro: | = 8 cm |
| Altura de la columna de agua sin incluir el sedimento: | = 12 cm |
| Área de la superficie: $3{,}142 \times 4^2$ | = 50,3 $cm^2$ |
| Tasa de aplicación: 500 g de la sustancia de ensayo/ha corresponde a 5 $\mu g/cm^2$ | |
| Total µg: $5 \times 50{,}3$ | = 251,5 µg |
| Ajuste de la cantidad en relación con una altura de 100 cm. | = 30,18 µg |
| $12 \times 251{,}5 \div 100$ | |
| Volumen de la columna de agua: $50{,}3 \times 12$ | = 603 ml |
| Concentración en el agua: $30{,}18 \div 603$ | = 0,050 \|µg/ml o 50 µg/l |

▼M1

## C.25. MINERALIZACIÓN AEROBIA EN AGUAS SUPERFICIALES. ENSAYO DE SIMULACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN

### 1. MÉTODO

El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 309 (2004) (1).

### 1.1. INTRODUCCIÓN

El objeto de este ensayo es medir la evolución temporal de la biodegradación de una sustancia problema a baja concentración en agua natural aerobia y cuantificar las observaciones en forma de expresiones cinéticas de velocidad. Este ensayo de simulación consiste en un ensayo discontinuo en matraces agitados en el laboratorio para determinar velocidades de biodegradación aerobia de sustancias orgánicas en muestras de aguas superficiales naturales (agua dulce, salobre o salada). Se basa en la norma ISO/DIS 14592-1 (2) e incluye también elementos de los métodos de ensayo C.23 y C.24 (3) (4). Cuando la duración del ensayo es larga, se puede optar por un procedimiento semicontinuo en lugar del discontinuo, con el fin de evitar el deterioro del microcosmos de ensayo. El objetivo principal del ensayo de simulación es determinar la mineralización de la sustancia problema en las aguas superficiales, y la mineralización constituye la base para expresar la cinética de degradación. Sin embargo, un posible objetivo secundario del ensayo es obtener información sobre la degradación primaria y la formación de los productos de transformación importantes. La identificación de los productos de transformación y, a ser posible, la cuantificación de sus concentraciones son especialmente importantes en el caso de las sustancias que se mineralizan muy despacio (por ejemplo, con vidas medias del $^{14}C$ total residual superiores a 60 días). Normalmente deben utilizarse concentraciones más elevadas de sustancia problema (por ejemplo, > 100 μg/l) para la identificación y cuantificación de los productos de transformación importantes, debido a las limitaciones analíticas.

Una baja concentración en este ensayo significa una concentración (por ejemplo, de menos de 1 μg/l a 100 μg/l) lo suficientemente baja para garantizar que la cinética de biodegradación obtenida en el ensayo refleja la cinética prevista en el medio ambiente. Comparada con la masa total de sustratos carbonados biodegradables presentes en el agua natural utilizada en el ensayo, la sustancia problema presente a concentración baja servirá de sustrato secundario. Esto significa que la cinética de biodegradación prevista es de primer orden (cinética independiente del «crecimiento») y que la sustancia problema puede degradarse por «cometabolismo». Una cinética de primer orden significa que la velocidad de degradación (mg/l/día) es proporcional a la concentración de sustrato, que se va reduciendo a lo largo del tiempo. Con una cinética realmente de primer orden, la constante específica de velocidad de degradación, k, es independiente del tiempo y de la concentración; es decir, k no varía apreciablemente a lo largo de la duración de un experimento y no cambia con la concentración añadida entre experimentos. Por definición, la constante específica de velocidad de degradación es igual al cambio relativo de concentración por unidad de tiempo: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Aunque en las condiciones establecidas lo previsible normalmente es una cinética de primer orden, puede haber circunstancias en que sea más adecuada otra cinética. Por ejemplo, pueden observarse desviaciones de la cinética de primer orden si la velocidad de biotransformación está limitada por fenómenos de transferencia de masas, como la velocidad de difusión, más que por la velocidad de reacción biológica. Sin embargo, los datos pueden describirse casi siempre con una cinética de pseudoprimer orden si se acepta una constante de velocidad dependiente de la concentración.

▼M1

Para facilitar el establecimiento del diseño experimental e interpretar los resultados, antes del ensayo debe disponerse de información sobre la biodegradabilidad de la sustancia problema a concentraciones más elevadas (por ejemplo, datos procedentes de ensayos preliminares) y de información sobre la degradabilidad abiótica, los productos de transformación y las propiedades fisicoquímicas pertinentes. El uso de sustancias problema marcadas con $^{14}C$ y la determinación de la distribución de fases del $^{14}C$ al final del ensayo permiten la determinación de la biodegradabilidad final. Cuando se utilice una sustancia problema no marcada, la biodegradación final solo se podrá estimar si se estudia una concentración superior y se conocen todos los productos de transformación mayoritarios.

1.2. DEFINICIONES

Se entenderá por:

**Biodegradación primaria**: el cambio estructural (transformación) de una sustancia química por microorganismos con el resultado de pérdida de la identidad química.

**Biodegradación funcional**: el cambio estructural (transformación) de una sustancia química por microorganismos con el resultado de pérdida de una propiedad específica.

**Biodegradación aerobia final**: la descomposición de una sustancia química por microorganismos en presencia de oxígeno hasta dar dióxido de carbono, agua y sales minerales de cualquier otro elemento presente (mineralización) y la producción de nueva biomasa y productos orgánicos de biosíntesis microbiana.

**Mineralización**: la descomposición de una sustancia química o materia orgánica por microorganismos en presencia de oxígeno hasta dar dióxido de carbono, agua y sales minerales de cualquier otro elemento presente.

**Tiempo de latencia**: el tiempo comprendido desde el inicio de un ensayo hasta que se consigue la adaptación de los microorganismos de degradación y aumenta hasta un nivel detectable el grado de biodegradación de una sustancia química o materia orgánica (por ejemplo, hasta el 10 % de la biodegradación teórica máxima, o menos, en función de la exactitud de la técnica de medición).

**Nivel máximo de biodegradación**: el grado de biodegradación de una sustancia química o materia orgánica presente en un ensayo, expresado en porcentaje, por encima del cual no se produce más biodegradación durante el ensayo.

**Sustrato primario**: el conjunto de fuentes naturales de carbono y energía que permiten el crecimiento y mantenimiento de la biomasa microbiana.

**Sustrato secundario**: un componente del sustrato presente en una concentración tan baja que mediante su degradación solo se proporcionan a los microorganismos competentes cantidades insignificantes de carbono y energía, en comparación con el carbono y la energía suministrados por la degradación de los componentes del sustrato principal (sustratos primarios).

**Constante de velocidad de degradación**: una constante cinética de velocidad de primer orden o pseudoprimer orden, k ($d^{-1}$), que indica la velocidad de los procesos de degradación. En caso de experimento discontinuo, k se estima basándose en la parte inicial de la curva de degradación obtenida tras el final del tiempo de latencia.

▼M1

**Vida media, $t_{1/2}$ (d)**: el término utilizado para caracterizar la velocidad de una reacción de primer orden, consistente en el intervalo de tiempo que corresponde a una reducción de la concentración a la mitad. La vida media y la constante de velocidad de degradación están relacionadas por la ecuación $t_{1/2} = \ln 2/k$.

**Vida media de degradación, $DT_{50}$ (d)**: el término utilizado para cuantificar el resultado de los ensayos de biodegradación, consistente en el intervalo de tiempo, incluido el de latencia, necesario para alcanzar el 50 % de biodegradación.

**Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOC)**: el límite de detección (LOD) es la concentración de una sustancia por debajo de la cual no se puede distinguir la identidad de la sustancia de la de artefactos analíticos; el límite de cuantificación (LOC) es la concentración de una sustancia por debajo de la cual no puede determinarse dicha concentración con una exactitud aceptable.

**Carbono orgánico disuelto (COD)**: la parte del carbono orgánico presente en una muestra de agua que no puede eliminarse por una separación de fases especificada como, por ejemplo, mediante centrifugación a 40 000 $ms^{-2}$ durante 15 min o mediante filtración por membrana con poros de 0,2 μm a 0,45 μm de diámetro.

**Actividad del $^{14}C$ orgánico total (AOT)**: la actividad total del $^{14}C$ relacionada con el carbono orgánico.

**Actividad del $^{14}C$ orgánico disuelto (AOD)**: la actividad total del $^{14}C$ relacionada con el carbono orgánico disuelto.

**Actividad del $^{14}C$ orgánico particulado (AOP)**: la actividad total del $^{14}C$ relacionada con el carbono orgánico particulado.

1.3. APLICABILIDAD DEL ENSAYO

El ensayo de simulación es aplicable a sustancias orgánicas no volátiles o débilmente volátiles estudiadas a bajas concentraciones. En la práctica, si se utilizan matraces abiertos a la atmósfera (por ejemplo, con tapón de algodón), puede considerarse que no son volátiles las sustancias que tienen constantes de la ley de Henry inferiores a aproximadamente 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (unas $10^{-5}$ $atm \cdot m^3/mol$). Si se utilizan matraces cerrados con cámara de aire, es posible estudiar sustancias ligeramente volátiles (con constantes de la ley de Henry < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ o < $10^{-3}$ $atm \cdot m^3/mol$) sin pérdidas del sistema de ensayo. Puede haber pérdidas de sustancias marcadas con $^{14}C$, si no se toman las debidas precauciones, cuando se elimina el $CO_2$. En tales situaciones, puede ser necesario atrapar el $CO_2$ en un absorbente interno con álcali o utilizar un sistema externo de absorción de $CO_2$ (determinación directa de $^{14}CO_2$; véase el apéndice 3). Para determinar la cinética de la biodegradación, la concentración de la sustancia problema debe ser inferior a su hidrosolubilidad. Sin embargo, ha de señalarse que los valores de hidrosolubilidad que se encuentran en la bibliografía pueden ser bastante más elevados que la solubilidad de la sustancia problema en aguas naturales. También es posible establecer la solubilidad de sustancias problema especialmente poco hidrosolubles utilizando las aguas naturales que son objeto del estudio.

El método puede utilizarse para simular la biodegradación en aguas superficiales libres de partículas gruesas (ensayo pelágico) o en aguas superficiales turbias que puede haber, por ejemplo, cerca de la interfaz agua/sedimento (ensayo con sedimento en suspensión).

▼M1

1.4. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo se efectúa de forma discontinua incubando la sustancia problema solo con agua superficial (ensayo pelágico) o con agua superficial a la que se ha añadido sedimento/sólidos en suspensión a la concentración de 0,01 a 1 g/l en peso seco (ensayo con sedimento en suspensión) para simular una masa de agua con sólidos en suspensión o con sedimento resuspendido. La concentración de sedimento/sólidos en suspensión en la parte inferior de este intervalo es representativa de la mayoría de las aguas superficiales. Los matraces de ensayo se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente, en condiciones aerobias y con agitación. Para determinar la cinética de degradación deben utilizarse al menos dos concentraciones diferentes de sustancia problema. Las concentraciones deben estar separadas por un factor de entre 5 y 10, y representar el intervalo de concentraciones previsto en el medio ambiente. La concentración máxima de la sustancia problema no debe superar los 100 µg/l, pero es preferible utilizar una concentración máxima en el ensayo por debajo de 10 µg/l o menos, para tener la certeza de que la biodegradación sigue una cinética de primer orden. La concentración mínima no debe superar los 10 µg/l, pero es preferible que sea del orden de 1 a 2 µg/l o incluso inferior a 1 µg/l. Normalmente puede efectuarse un análisis adecuado de concentraciones tan bajas utilizando sustancias marcadas con $^{14}C$ disponibles en el mercado. Debido a las limitaciones analíticas, con frecuencia resulta imposible medir la concentración de la sustancia problema con la exactitud exigida si dicha concentración es ≤ 100 µg/l (véase el párrafo segundo del punto 1.7.2). Pueden emplearse concentraciones superiores de sustancia problema (> 100 µg/l y a veces > 1 mg/l) para la identificación y cuantificación de los productos de transformación mayoritarios o si no se dispone de un método específico de análisis con un límite de detección bajo. Si se estudian concentraciones elevadas de sustancia problema, quizás sea imposible utilizar los resultados para estimar la constante de degradación de primer orden y la vida media, ya que probablemente la degradación no va a seguir una cinética de primer orden.

La degradación se va estudiando a intervalos adecuados, midiendo el $^{14}C$ residual o la concentración residual de sustancia problema si se utiliza un análisis químico específico. El marcado con $^{14}C$ de la parte más estable de la molécula permite la determinación de la mineralización total, mientras que el marcado con $^{14}C$ de una parte menos estable de la molécula, así como el uso de análisis específicos, permite la evaluación de solo la biodegradación primaria. Sin embargo, la parte más estable no incluye necesariamente la fracción funcional pertinente de la molécula (que puede relacionarse con una propiedad específica, como toxicidad, bioacumulación, etc.). En tal caso, puede ser apropiado utilizar una sustancia problema marcada con $^{14}C$ en la parte funcional para estudiar la eliminación de la propiedad específica.

1.5. INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

En este ensayo pueden utilizarse sustancias problema tanto radiomarcadas como sin marcar. Se recomienda la técnica del marcado con $^{14}C$, normalmente en la parte o partes más estables de la molécula (véase también el punto 1.4). En el caso de sustancias que contienen más de un anillo aromático, es preferible que estén marcados con $^{14}C$ uno o más carbonos de cada anillo. Por otra parte, es aconsejable que estén marcados con $^{14}C$ uno o varios carbonos a cada lado de los enlaces fácilmente degradables. La pureza química y/o radioquímica de la sustancia problema debe ser > 95 %. En caso de sustancias radiomarcadas, se recomienda una actividad específica de unos 50 µCi/mg (1,85 MBq) o más, a fin de facilitar las mediciones de $^{14}C$ en ensayos efectuados con bajas concentraciones iniciales. Debe disponerse de la siguiente información sobre la sustancia problema:

▼**M1**

— hidrosolubilidad [Método A.6],

— solubilidad en disolventes orgánicos (sustancias aplicadas con disolventes o con baja hidrosolubilidad),

— constante de disociación (pKa) si es fácil que la sustancia tome o pierda protones [OCDE TG 112] (5),

— presión de vapor [Método A.4] y constante de la ley de Henry,

— estabilidad química en el agua y en la oscuridad (hidrólisis) [Método C.7].

Cuando se estudian en agua de mar sustancias poco hidrosolubles, puede ser útil conocer también el parámetro del efecto salino (o «constante de Setschenow») $K^s$, definida por la expresión siguiente: $\log (S/S') = K^s C_m$, donde S y S' son la solubilidad de la sustancia en agua dulce y agua de mar, respectivamente, y $C_m$ es la concentración molar de sales.

Si el ensayo se realiza como «ensayo con sedimento en suspensión», debe disponerse asimismo de la información siguiente:

— coeficiente de reparto n-octanol/agua [Método A.8],

— coeficiente de adsorción [Método C.18].

Los siguientes datos también pueden ser útiles:

— concentración en el medio ambiente (valor conocido o estimación),

— toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos [Método C.11],

— biodegradabilidad fácil o inherente [Métodos C.4 A-F, C.12, C.9, OCDE TG 302 (5)],

— estudios de biodegradabilidad aerobia o anaerobia en el suelo y transformación en sedimentos/agua [Métodos C.23, C.24].

1.6. SUSTANCIA DE REFERENCIA

Debe utilizarse como sustancia de referencia una sustancia que normalmente se degrade con facilidad en condiciones aerobias (por ejemplo, anilina o benzoato de sodio). Normalmente, el tiempo previsto de degradación de la anilina y del benzoato de sodio es inferior a 2 semanas. El objeto de las sustancias de referencia es garantizar que la actividad microbiana del agua estudiada esté dentro de ciertos límites; es decir, que el agua contenga una población microbiana activa.

▼**M1**

1.7. CRITERIOS DE CALIDAD

1.7.1. **Recuperación**

Inmediatamente tras la adición de la sustancia problema, debe verificarse cada concentración inicial de ensayo midiendo la actividad de $^{14}C$, o efectuando análisis químicos en caso de sustancias sin marcar, en muestras al menos duplicadas. Así se obtiene información sobre la aplicabilidad y repetibilidad del método analítico y sobre la homogeneidad de la distribución de la sustancia problema. Normalmente, el valor de actividad de $^{14}C$ o de concentración de sustancia problema medido al principio se utiliza en los análisis posteriores de los datos en vez de la concentración nominal, ya que así se compensan las pérdidas debidas a la adsorción y los errores de dosificación. En caso de sustancia problema marcada con $^{14}C$, el nivel de recuperación al final del experimento viene dado por el balance de masas (véase el último párrafo del punto 1.8.9.4). Lo ideal es que el balance de masa con marcado radiactivo esté entre el 90 y el 110 %, mientras que la exactitud analítica debe llevar a una recuperación inicial de entre el 70 y el 110 % con sustancias problema sin marcar. Estos intervalos deben interpretarse como objetivos y no utilizarse como criterios de aceptación del ensayo. También se puede determinar la exactitud analítica con la sustancia problema a una concentración inferior a la inicial y con los productos de transformación mayoritarios.

1.7.2. **Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

La repetibilidad del método analítico (incluida la eficiencia de la extracción inicial) para cuantificar la sustancia problema y, en su caso, los productos de transformación debe comprobarse analizando cinco réplicas de los distintos extractos del agua superficial.

Siempre que sea posible, el límite de detección (LOD) del método analítico con la sustancia problema y con los productos de transformación debe ser el 1 % o menos de la cantidad inicial utilizada en el sistema de ensayo. El límite de cuantificación (LOC) debe ser igual o inferior al 10 % de la concentración utilizada. Los análisis químicos de muchas sustancias orgánicas y de sus productos de transformación exigen con frecuencia que la sustancia problema se aplique en concentraciones relativamente elevadas, es decir, > 100 μg/l.

1.8. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

1.8.1. **Equipo**

El ensayo puede realizarse en matraces Erlenmeyer o en vasos cilíndricos de la capacidad adecuada (por ejemplo, 0,5 o 1,0 litros) cerrados con tapones de silicona o caucho, o en matraces de suero con tapas herméticas al $CO_2$ como, por ejemplo, diafragmas de caucho butílico. Otra posibilidad es efectuar el ensayo utilizando varios matraces y recoger matraces enteros, al menos por duplicado, en cada intervalo de muestreo (véase el último párrafo del punto 1.8.9.1). Si las sustancias problema no son volátiles ni están radiomarcadas, no será necesario utilizar tapones ni tapas herméticos a los gases, y será suficiente con tapones de algodón flojos que impidan la entrada de contaminación desde el aire (véase el párrafo segundo del punto 1.8.9.1). Las sustancias químicas ligeramente volátiles deben ensayarse en un sistema biométrico con agitación suave de la superficie del agua. Para asegurarse de que no se produce contaminación bacteriana, se puede optar por esterilizar los recipientes calentándolos o pasándolos por autoclave antes de utilizarlos. Además se utilizará el siguiente equipo normal de laboratorio:

— plataforma de agitación o agitadores magnéticos para la agitación continua de los matraces de ensayo,

▼**M1**

— centrifugadora,

— pH metro,

— turbidímetro para mediciones de turbidez nefelométrica,

— estufa u horno microondas para determinaciones del peso seco,

— equipo de filtración por membrana,

— autoclave o estufa para esterilización de material de vidrio por calor,

— instalaciones para la manipulación de sustancias marcadas con $^{14}C$,

— equipo para cuantificar la actividad de $^{14}C$ en muestras de soluciones de captura de $CO_2$ y, en caso necesario, en muestras de sedimento,

— equipo analítico para la determinación de la sustancia problema (y de referencia) si se utiliza un análisis químico específico (por ejemplo, cromatógrafo de gases, cromatógrafo de líquidos de alta presión).

1.8.2. **Soluciones madre de sustancia problema**

Se utiliza agua desionizada para preparar las soluciones madre de las sustancias problema y de referencia (véase el párrafo primero del punto 1.8.7). El agua desionizada estará libre de sustancias que puedan ser tóxicas para los microorganismos, y la concentración de carbono orgánico disuelto (COD) no será mayor de 1 mg/l (6).

1.8.3. **Recogida y transporte del agua superficial**

El lugar de muestreo para la recogida del agua superficial se seleccionará de acuerdo con el objetivo del ensayo en cada caso. Al seleccionar los lugares de muestreo se atenderá a los antecedentes de posibles aportes de material agrícola, industrial o doméstico. Si se sabe que un entorno acuático ha sido contaminado con la sustancia problema o sus análogos estructurales en los cuatro años anteriores, no se utilizará para la recogida de agua para el ensayo, salvo que lo que se pretenda sea precisamente investigar las velocidades de degradación en lugares previamente expuestos. Se medirán en el lugar de recogida tanto el pH como la temperatura del agua. Por otra parte, se anotarán la profundidad del muestreo y el aspecto de la muestra de agua (por ejemplo, color y turbidez) (véase el punto 3). Deben medirse la concentración de oxígeno y el potencial redox del agua y de la capa superficial de los sedimentos, a fin de demostrar la presencia de condiciones aerobias, salvo que sea evidente a partir del aspecto y de los datos anteriores sobre el mismo lugar. El agua superficial debe transportarse en un recipiente limpiado a fondo. Durante el transporte, la temperatura de la muestra no deberá superar significativamente la temperatura que se vaya a utilizar en el ensayo. Se recomienda refrigerar a 4 °C si el transporte va a durar más de 2 o 3 horas. No debe congelarse la muestra de agua.

▼M1

1.8.4. **Conservación y preparación del agua superficial**

El ensayo debe iniciarse preferentemente en el plazo de un día desde la recogida de la muestra. En caso necesario, el agua puede conservarse durante un tiempo que debe reducirse al mínimo, sin superar en ningún caso las 4 semanas. La muestra de agua se mantendrá a 4 °C con aireación hasta su utilización. Antes de utilizarse, se retirarán las partículas gruesas, por ejemplo mediante paso por filtro de nailon con una luz de malla aproximada de 100 μm o por papel de filtro grueso, o mediante sedimentación.

1.8.5. **Preparación del agua con adición de sedimento (opcional)**

Para el ensayo con sedimento en suspensión, se añade sedimento superficial a los matraces que contienen agua natural (filtrada para retirar las partículas gruesas como se describe en el punto 1.8.4) a fin de obtener una suspensión; la concentración de sólidos en suspensión debe estar entre 0,01 y 1 g/l. El sedimento superficial debe proceder del mismo lugar del que se haya tomado la muestra de agua. En función del entorno acuático de que se trate, el sedimento superficial puede caracterizarse por un elevado contenido de carbono orgánico (2,5 a 7,5 %) y una textura fina o bien por un bajo contenido de carbono orgánico (0,5 a 2,5 %) y una textura gruesa (3). El sedimento superficial puede prepararse de la forma siguiente: se extraen varias calas de sedimento utilizando un tubo de plástico transparente, se separan las capas aerobias superiores (desde la superficie hasta una profundidad máxima de 5 mm) inmediatamente después de la extracción y se juntan todas. La muestra de sedimento así obtenida se transporta en un recipiente con una gran cámara de aire para mantener el sedimento en condiciones aerobias (y refrigerado a 4 °C si la duración del transporte supera las 2 o 3 horas). La muestra de sedimento debe suspenderse en el agua del ensayo en la proporción de 1:10 y mantenerse a 4 °C con aireación hasta su utilización. En caso necesario, el sedimento puede conservarse durante un tiempo que debe reducirse al mínimo, sin superar en ningún caso las 4 semanas.

1.8.6. **Procedimiento semicontinuo (facultativo)**

Puede ser necesaria una incubación prolongada (varios meses) si hay un largo tiempo de latencia antes de que se pueda medir una degradación significativa de la sustancia problema. Si esto se sabe por ensayos anteriores efectuados con la sustancia, el ensayo puede iniciarse con un procedimiento semicontinuo que permita la renovación periódica de una parte del agua o suspensión de ensayo (véase el apéndice 2). Otra posibilidad es pasar el ensayo discontinuo normal a ensayo semicontinuo si al cabo de unos 60 días de seguir el procedimiento discontinuo no se aprecia ninguna degradación de la sustancia problema (véase el párrafo segundo del punto 1.8.8.3).

1.8.7. **Adición de la sustancia problema (o de referencia)**

En el caso de sustancias con elevada hidrosolubilidad (> 1 mg/l) y baja volatilidad (constantes de la ley de Henry < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ o < $10^{-5}$ $atm \cdot m^3/mol$), puede prepararse una solución madre en agua desionizada (véase el punto 1.8.2); después se añade el volumen adecuado de la solución madre a los recipientes de ensayo para conseguir la concentración deseada. El volumen de las eventuales soluciones madre añadidas debe mantenerse en el mínimo posible (< 10 % del volumen final de líquido, a ser posible). Otro procedimiento es disolver la sustancia problema en un volumen mayor de agua de ensayo, lo que puede considerarse como un alternativa al uso de disolventes orgánicos.

▼M1

Si no hay otra posibilidad, se prepararán soluciones madre de las sustancias no volátiles con escasa hidrosolubilidad utilizando un disolvente orgánico volátil, pero la cantidad de disolvente añadido al sistema de ensayo no debe superar el 1 % v/v ni tener efectos adversos sobre la actividad microbiana. El disolvente no debe afectar a la estabilidad de la sustancia problema en el agua. El disolvente debe eliminarse para que no quede más que una pequeñísima cantidad, a fin de que no aumente significativamente la concentración de COD en el agua o suspensión de ensayo. Esto debe comprobarse realizando un análisis específico de la sustancia o, a ser posible, un análisis de COD (6). Ha de tenerse cuidado para limitar la cantidad de disolvente transferido al mínimo absolutamente necesario, y velar por que toda la cantidad de sustancia problema pueda disolverse en el volumen final de agua de ensayo. Pueden utilizarse otras técnicas para introducir la sustancia problema en los recipientes de ensayo, como se describe en las referencias (7) y (8). Cuando se utilice un disolvente orgánico para introducir la sustancia problema, habrá unos controles de disolvente, que contendrán agua de ensayo (sin añadidos) y agua de ensayo con la sustancia de referencia añadida y se tratarán de forma similar a los recipientes de ensayo activo en los que se introduce la sustancia problema disuelta en el disolvente. El objeto de los controles de disolvente consiste en examinar los posibles efectos negativos causados por el disolvente en la población microbiana, siguiendo la degradación de la sustancia de referencia.

1.8.8. **Condiciones de ensayo**

1.8.8.1. *Temperatura del ensayo*

La incubación debe efectuarse en un lugar de preferencia oscuro, o bien con luz difusa, y a temperatura controlada (± 2 °C), que puede ser la temperatura de campo o una temperatura normal de 20 a 25 °C. La temperatura de campo puede ser la temperatura real de la muestra en el momento del muestreo o la temperatura de campo media del lugar de muestreo.

1.8.8.2. *Agitación*

Debe efectuarse una agitación continua para mantener en suspensión las partículas y microorganismos. La agitación también facilita la transferencia de oxígeno desde la cámara de aire hacia el líquido para mantener unas condiciones aerobias adecuadas. Los matraces se ponen en una plataforma de agitación (de unas 100 rpm) o se utilizan agitadores magnéticos. La agitación debe ser continua. Sin embargo, también debe ser lo más suave posible, siempre que se mantenga una suspensión homogénea.

1.8.8.3. *Duración del ensayo*

La duración del ensayo no debe superar en principio los 60 días, salvo que se siga un procedimiento semicontinuo con renovación periódica de la suspensión de ensayo (véanse el punto1.8.6 y el apéndice 2). Sin embargo, si en los primeros 60 días se ha iniciado la degradación de la sustancia problema, puede ampliarse hasta un máximo de 90 días la duración del ensayo con un procedimiento discontinuo. Se va siguiendo la evolución de la degradación a intervalos adecuados, determinando la actividad del $^{14}C$ residual o del $^{14}CO_2$ formado (véase el punto 1.8.9.4) o realizando análisis químicos (véase el punto 1.8.9.5). El período de incubación debe tener la duración suficiente para que se pueda evaluar el proceso de degradación. La amplitud de la degradación debe superar preferentemente el 50 %; en caso de sustancias lentamente degradables, la amplitud de la degradación debe ser suficiente (en principio, más del 20 %) para permitir la estimación de la constante de velocidad de degradación cinética.

▼M1

Deben medirse periódicamente el pH y la concentración de oxígeno en el sistema de ensayo, salvo que la experiencia anterior con ensayos similares de muestras de agua y sedimento tomados del mismo lugar haga innecesarias tales mediciones. En ciertas circunstancias, el metabolismo de sustratos primarios en concentraciones mucho más elevadas en el agua o sedimento podría provocar la formación de $CO_2$ y el agotamiento del oxígeno en una proporción suficiente para alterar significativamente las condiciones experimentales durante el ensayo.

1.8.9. **Procedimiento**

1.8.9.1. *Preparación de matraces para el ensayo pelágico*

Se pasa un volumen adecuado de agua de ensayo a los matraces, hasta un tercio aproximadamente del volumen de estos, sin bajar de unos 100 ml. Si se utilizan varios matraces (para que se puedan recoger matraces enteros en cada tiempo de muestreo), el volumen adecuado de agua de ensayo será también de unos 100 ml, ya que unos volúmenes pequeños de muestra pueden influir en la duración del tiempo de latencia. La sustancia problema se añade a partir de una solución madre como se describe en los puntos 1.8.2 y 1.8.7. Deben utilizarse al menos dos concentraciones diferentes de sustancia problema, relacionadas por una razón de entre 5 y 10, a fin de determinar la cinética de degradación y calcular la constante de velocidad de degradación cinética. Las dos concentraciones seleccionadas deben estar por debajo de 100 μg/l y lo mejor es que se encuentren en el intervalo de < 1-10 μg/l.

Los matraces se cierran con tapones o tapas impermeables al aire y al $CO_2$. En caso de sustancias problema no volátiles y no marcadas con $^{14}C$, es adecuado utilizar tapones de algodón flojos que impidan la contaminación por el aire (véase el punto 1.8.1), siempre que se sepa que los productos de degradación importantes no son volátiles y si se efectúa una determinación indirecta de $CO_2$ (véase el apéndice 3).

Los matraces se incuban a la temperatura seleccionada (véase el punto 1.8.8.1). Se toman muestras para el análisis químico o la medición del $^{14}C$ al inicio del ensayo (es decir, antes de que empiece la degradación; véase el punto 1.7.1) y después a intervalos adecuados a lo largo de la duración del ensayo. El muestreo puede efectuarse retirando submuestras (por ejemplo, alícuotas de 5 ml) de cada réplica o recogiendo matraces enteros en cada tiempo de muestreo. La mineralización de la sustancia problema puede determinarse directa o indirectamente (véase el apéndice 3). Normalmente hace falta un mínimo de cinco puntos de muestreo a lo largo de la fase de degradación (es decir, después del final del tiempo de latencia) para establecer una constante de velocidad fiable, salvo que pueda justificarse que tres puntos de muestreo son suficientes con sustancias rápidamente degradables. En caso de sustancias que no se degradan rápidamente pueden hacerse con facilidad más mediciones durante la fase de degradación y, por tanto, deben utilizarse más puntos para la estimación de k. No puede indicarse un programa fijo de muestreo, ya que la velocidad de biodegradación varía; sin embargo, se recomienda tomar una muestra cada semana si la degradación es lenta. Si la sustancia es rápidamente degradable, el muestreo debe hacerse una vez al día durante los tres primeros días y después cada dos o tres días. En ciertas circunstancias, como cuando las sustancias se hidrolizan muy rápidamente, puede ser necesario tomar muestras cada hora. Se recomienda efectuar un estudio preliminar antes del ensayo para determinar los intervalos de muestreo adecuados. Si hacen falta muestras para otros análisis específicos, se recomienda tomar más muestras y seleccionar después las que vayan a analizarse al final del experimento siguiendo una estrategia hacia atrás, es decir, analizando primero las últimas muestras (véase en el párrafo segundo del punto 1.8.9.5 información sobre la estabilidad de las muestras durante su conservación).

▼**M1**

1.8.9.2. *Número de matraces y muestras*

Se reserva un número suficiente de matraces de ensayo para los siguientes usos:

— matraces de ensayo; matraces al menos duplicados de cada concentración de sustancia problema (es preferible un mínimo de 3) o varios matraces de ensayo para cada concentración si se van a tomar matraces enteros en cada tiempo de muestreo (símbolo: $F_T$),

— matraces de ensayo para el cálculo del balance de masas; matraces al menos duplicados de cada concentración de ensayo (símbolo: $F_M$),

— ensayo en blanco, sin sustancia problema; al menos un matraz para el ensayo en blanco, solo con agua de ensayo (símbolo: $F_B$),

— control de referencia; matraces duplicados con sustancia de referencia (por ejemplo, anilina o benzoato de sodio, a 10 µg/l) (símbolo: $F_C$). El objeto del control de referencia es confirmar la presencia de un mínimo de actividad microbiana. Si resulta procedente, puede utilizarse una sustancia de referencia radiomarcada, incluso aunque la degradación de la sustancia problema se vaya siguiendo mediante análisis químicos,

— control estéril; uno o dos matraces con agua de ensayo esterilizada para examinar la posible degradación abiótica u otro tipo de eliminación no biológica de la sustancia problema (símbolo: $F_S$). La actividad biológica puede interrumpirse pasando por autoclave (121 °C; 20 min) el agua de ensayo o añadiendo un tóxico (por ejemplo, azida de sodio ($NaN_3$) a la concentración de 10-20 g/l, cloruro mercúrico ($HgCl_2$) a la de 100 mg/l o formol a la de 100 mg/l) o con rayos gamma. Si se utiliza $HgCl_2$, debe eliminarse luego como residuo tóxico. Si se han añadido al agua grandes cantidades de sedimento, no es fácil conseguir condiciones estériles; en tal caso, se recomienda repetir el tratamiento en autoclave (por ejemplo, tres veces). Debe tenerse en cuenta que el tratamiento en autoclave puede alterar las características de adsorción del sedimento,

— controles de disolventes, con agua de ensayo más sustancia de referencia y con agua de ensayo sin esta sustancia; matraces duplicados con la misma cantidad de disolvente y sometidos al mismo procedimiento que para la aplicación de la sustancia problema. Lo que se pretende es examinar los posibles efectos adversos del disolvente determinando la degradación de la sustancia de referencia.

Al diseñar el ensayo, el investigador ha de considerar la importancia relativa del aumento de la replicación experimental frente al aumento del número de tiempos de muestreo. El número exacto de matraces necesarios depende del método utilizado para medir la degradación (véase el párrafo tercero del punto 1.8.9.1, el punto 1.8.9.4 y el apéndice 3).

▼**M1**

A cada tiempo de muestreo se toman dos submuestras (por ejemplo, alícuotas de 5 ml) de cada matraz de ensayo. Si se utilizan varios matraces para permitir recoger matraces enteros, debe tomarse un mínimo de dos matraces a cada tiempo de muestreo (véase el párrafo primero del punto 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Preparación de matraces para el ensayo con sedimento en suspensión (opcional)*

Se añaden a los recipientes de ensayo los volúmenes necesarios de agua de ensayo y sedimento, en su caso (véase el punto 1.8.5). La preparación de los matraces para el ensayo con sedimento en suspensión es igual que para el ensayo pelágico (véanse los puntos 1.8.9.1 y 1.8.9.2). Es mejor utilizar botellas de suero o matraces de forma similar. Los matraces cerrados se colocan horizontalmente en un agitador. Evidentemente, los matraces abiertos con sustancias no volátiles y no marcadas con $^{14}C$ deben colocarse de pie; en tal caso se recomienda la agitación magnética con varillas magnéticas recubiertas de cristal. Cuando sea necesario habrá que airear las botellas para mantener unas condiciones aerobias adecuadas.

1.8.9.4. *Determinaciones radioquímicas*

La cantidad de $^{14}CO_2$ producida se mide directa e indirectamente (véase el apéndice 3). La cantidad de $^{14}CO_2$ se determina indirectamente por la diferencia entre la actividad inicial de $^{14}C$ en el agua o suspensión de ensayo y la actividad total residual al tiempo del muestreo medida tras acidificar la muestra hasta un pH de 2-3 y eliminar el $CO_2$. El carbono inorgánico queda así eliminado y la actividad residual medida corresponderá al material orgánico. No debe efectuarse la determinación indirecta del $^{14}CO_2$ si de la transformación de la sustancia problema se forman productos volátiles principalmente (véase el apéndice 3). A ser posible, la evolución del $^{14}CO_2$ debe medirse directamente (véase el apéndice 3) a cada tiempo de muestreo en al menos un matraz de ensayo; este procedimiento permite que se comprueben tanto el balance de masa como el proceso de biodegradación, pero está limitado a los ensayos efectuados con recipientes cerrados.

Si el $^{14}CO_2$ formado se mide directamente durante el ensayo, deben reservarse más matraces a este efecto al inicio del ensayo. Se recomienda la determinación directa del $^{14}CO_2$ si de la transformación de la sustancia problema se forman productos volátiles importantes. A cada tiempo de medición, los matraces de ensayo adicionales se acidifican hasta obtener un pH de 2-3 y el $^{14}CO_2$ se recoge en un absorbente interno o externo (véase el apéndice 3).

Se puede optar por determinar las concentraciones de sustancias problema y productos de transformación mayoritarios marcados con $^{14}C$, mediante radiocromatografía (por ejemplo, cromatografía de capa fina, RAD-TLC) o HPLC con detección radioquímica.

También se puede determinar la distribución en fases de la radiactividad restante (véase el apéndice 1), así como la sustancia problema residual y los productos de transformación.

▼**M1**

Al final del ensayo ha de determinarse el balance de masa mediante medición directa del $^{14}CO_2$ utilizando matraces de ensayo aparte, de los que no se haya tomado ninguna muestra durante el desarrollo del ensayo (véase el apéndice 3).

1.8.9.5. *Análisis químico específico*

Si se dispone de un método de análisis específico y sensible, la biodegradación primaria puede evaluarse midiendo la concentración residual total de sustancia problema en lugar de aplicar técnicas de radiomarcado. Si se utiliza una sustancia problema radiomarcada (para medir la mineralización total), pueden hacerse en paralelo análisis químicos específicos para conseguir información adicional útil y comprobar el procedimiento. Los análisis químicos específicos también pueden utilizarse para medir los productos de transformación formados durante la degradación de la sustancia problema, lo que se recomienda en caso de sustancias cuya vida media de mineralización sea superior a 60 días. Se mide y se registra la concentración de la sustancia problema y de los productos de transformación en cada tiempo de muestreo (como concentración y como porcentaje de la sustancia aplicada). En general, deben identificarse los productos de transformación detectados en cualquier tiempo de muestreo, a concentraciones ≥ 10 % de la concentración aplicada, salvo que se justifique otra opción. Habrá de tomarse también en consideración la identificación de los productos de transformación cuyas concentraciones aumenten continuamente durante el estudio, aunque tales concentraciones no superen los límites indicados anteriormente, ya que este aumento puede indicar persistencia. Debe considerarse la realización de análisis de los productos de transformación en los controles estériles si se piensa que es posible una transformación abiótica rápida de la sustancia problema (por ejemplo, hidrólisis). Debe sopesarse en cada caso la necesidad de cuantificar e identificar los productos de transformación, indicando en el informe las justificaciones pertinentes. Las técnicas de extracción con disolventes orgánicos deben aplicarse según las instrucciones del procedimiento analítico correspondiente.

Todas las muestras se conservarán a una temperatura de 2 a 4 °C en recipientes herméticos al aire si el análisis se realiza en el plazo de 24 horas (método preferible). Para una conservación más prolongada, las muestras deben congelarse por debajo de –18 °C o tratarse químicamente. No se recomienda la acidificación para conservar las muestras, ya que las muestras acidificadas pueden ser inestables. Si las muestras no se analizan en el plazo de 24 horas y se conservan durante más tiempo, debe efectuarse un estudio de la estabilidad ante la conservación a fin de demostrar la estabilidad de las sustancias de interés cuando se congelan por debajo de –18 °C o se conservan químicamente. Si el método analítico implica la extracción bien con disolventes o bien en fase sólida, la extracción se efectuará inmediatamente tras el muestreo o tras conservar la muestra refrigerada durante un máximo de 24 horas.

En función de la sensibilidad del método analítico, puede ser necesario disponer de volúmenes de muestra mayores que los indicados en el punto 1.8.1. El ensayo puede realizarse fácilmente con volúmenes de ensayo de un litro en matraces de 2-3 litros, lo que permite recoger muestras de unos 100 ml.

▼M1

2. **DATOS E INFORME**

2.1. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

2.1.1. **Representación gráfica de los datos**

Los tiempos de muestreo se redondean a horas enteras (salvo si la sustancia se degrada significativamente en cuestión de minutos u horas) pero no a días enteros. Se representan frente al tiempo las estimaciones de la actividad residual de la sustancia problema (en caso de sustancias marcadas con $^{14}C$) o de la concentración residual (en caso de sustancias no marcadas), tanto de forma lineal como semilogarítmica (véanse las figuras 1a y 1b). Si ha habido degradación, se comparan los resultados de los matraces $F_T$ con los de los matraces $F_S$. Si las medias de los resultados de los matraces con sustancia problema ($F_T$) y los matraces estériles ($F_S$) se desvían en menos del 10 %, puede aceptarse que la degradación observada es predominantemente abiótica. Si la degradación en los matraces $F_S$ es menor, las cifras pueden utilizarse para corregir las obtenidas con los matraces $F_T$ (por sustracción) a fin de estimar la amplitud de la biodegradación. Cuando se efectúan análisis opcionales de productos de transformación mayoritarios, deben hacerse gráficas de su formación y desaparición, además de la gráfica de desaparición de la sustancia problema.

La duración del tiempo de latencia $t_L$ se estima a partir de la curva de degradación (representación semilogarítmica) extrapolando su parte lineal a la degradación nula, o bien determinando el tiempo correspondiente a una degradación aproximada del 10 % (véanse las figuras 1a y 1b). A partir de la representación semilogarítmica se estiman la constante de velocidad de primer orden, k, y su error estándar mediante regresión lineal de la gráfica ln (actividad residual de $^{14}C$ o concentración de sustancia problema) frente al tiempo. Con las mediciones de $^{14}C$ en particular, debe recurrirse solo a datos pertenecientes a la parte lineal inicial de la curva tras el final del tiempo de latencia, y darse preferencia a la selección de unos pocos datos representativos, en vez de a un número mayor de datos más inciertos. La incertidumbre incluye aquí errores inherentes al uso directo recomendado de mediciones de la actividad residual de $^{14}C$ (véase más abajo). A veces puede ser pertinente calcular dos constantes de velocidad diferentes, si la degradación sigue un modelo bifásico. Con este objeto se definen dos fases diferentes de la curva de degradación. Deben calcularse la constante de velocidad, k, y la vida media, $t_{½} = \ln 2/k$, correspondientes a cada uno de los matraces replicados si se toman submuestras del mismo matraz, o utilizando los valores medios si se toman matraces enteros a cada tiempo de muestreo (véase el último párrafo del punto 1.8.9.2). Cuando se utilice el procedimiento mencionado en primer lugar, deben indicarse la constante de velocidad y la vida media correspondientes a cada uno de los distintos matraces replicados, así como un valor medio con su error estándar. Si se han utilizado concentraciones elevadas de sustancia problema, la curva de degradación puede desviarse considerablemente de una recta (representación semilogarítmica), con lo que no sería válida la cinética de primer orden. Por tanto, no tendría sentido definir una vida media. Sin embargo, con un intervalo limitado de datos, puede aplicarse una cinética de pseudoprimer orden y estimarse el semiperíodo de degradación, $DT_{50}$ (tiempo trascurrido hasta alcanzar una degradación del 50 %). No obstante, ha de recordarse que la evolución temporal de la degradación más allá del intervalo seleccionado de datos no puede predecirse utilizando el $DT_{50}$, que es simplemente un descriptor de un conjunto determinado de datos. Se dispone de herramientas analíticas para facilitar los cálculos estadísticos y el ajuste de la curva, y se recomienda el uso de este tipo de programas informáticos.

▼M1

Si se realizan análisis químicos específicos, se estiman las constantes de velocidad y las vidas medias de la degradación primaria de la misma forma que se indicaba antes para la mineralización total. Si la degradación primaria es el proceso limitante, a veces es posible utilizar puntos de datos de todo el proceso de degradación. Esto es así porque las mediciones son directas, a diferencia de las mediciones de la actividad de $^{14}C$.

Si se utilizan sustancias marcadas con $^{14}C$, hay que expresar un balance de masas en porcentaje de la concentración inicial aplicada, al menos al final del ensayo.

2.1.2. **Actividad residual**

Cuando se biodegrada la parte marcada con $^{14}C$ de una sustancia orgánica, la mayor parte del $^{14}C$ se convierte en $^{14}CO_2$, mientras que otra parte se destina al crecimiento de la biomasa o a la síntesis de metabolitos extracelulares. Por tanto, la biodegradación «final» completa de una sustancia no produce la conversión del 100 % de su carbono en $^{14}CO_2$. El $^{14}C$ integrado en productos formados por biosíntesis se libera después lentamente como $^{14}CO_2$, debido a una «mineralización secundaria». Por este motivo, la representación gráfica de la actividad de $^{14}C$ orgánico residual (medida tras la eliminación del $CO_2$) o del $^{14}CO_2$ producido frente al tiempo mostrará una «cola» después de que haya terminado la degradación. Esto complica la interpretación cinética de los datos, y, con este propósito, solo debe utilizarse normalmente la parte inicial de la curva (después de que haya terminado el tiempo de latencia y antes de que se alcance aproximadamente el 50 % de degradación) para la estimación de la constante de velocidad de degradación. Si se degrada la sustancia problema, la actividad residual total de $^{14}C$ orgánico siempre será mayor que la actividad de $^{14}C$ relacionada con la sustancia problema que quede intacta. Si la sustancia problema se degrada según una reacción de primer orden y una fracción constante $\alpha$ se mineraliza pasando a $CO_2$, la pendiente inicial de la curva de desaparición del $^{14}C$ ($^{14}C$ orgánico total frente al tiempo) será el resultado de multiplicar por $\alpha$ la pendiente de la curva correspondiente a la concentración de la sustancia problema (o, para mayor precisión, de la parte de la sustancia problema marcada con $^{14}C$). Al utilizarse mediciones de la actividad total de $^{14}C$ orgánico sin corregir, la constante de velocidad de degradación calculada será, por tanto, de tipo conservador. En la bibliografía (2) (9) (10) (11) se describen procedimientos para estimar las concentraciones de la sustancia problema a partir de las actividades radioquímicas medidas, aplicando distintas hipótesis simplificadoras. Tales procedimientos son sobre todo aplicables a las sustancias rápidamente degradables.

2.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Si se ve que k es independiente de la concentración añadida (es decir, si la k calculada es aproximadamente igual a las distintas concentraciones de la sustancia problema), puede aceptarse que la constante de velocidad de primer orden es representativa de las condiciones de ensayo aplicadas: la sustancia problema, la muestra de agua y la temperatura de ensayo. Un juicio experto debe evaluar en qué medida los resultados pueden generalizarse o extrapolarse a otros sistemas. Si se utiliza una elevada concentración de sustancia problema, y por tanto la degradación no sigue una cinética de primer orden, los datos no podrán utilizarse para la estimación directa de una constante de velocidad de primer orden o una vida media correspondiente. Sin embargo, los datos procedentes de un ensayo en el que se utilice una elevada concentración de sustancia problema podrán ser útiles al menos para estimar el grado de mineralización total o para detectar y cuantificar los productos de transformación.

▼M1

Si se conocen las velocidades de otros procesos de pérdida distintos de la biodegradación (por ejemplo, hidrólisis o volatilización), podrán sustraerse de la velocidad de pérdida neta observada durante el ensayo para dar una estimación aproximada de la velocidad de biodegradación. Por ejemplo, pueden obtenerse datos sobre la hidrólisis con los controles estériles o con ensayos paralelos en los que se utilicen concentraciones superiores de la sustancia problema.

La determinación indirecta y directa del $^{14}CO_2$ (punto 1.8.9.4 y apéndice 3) solo puede utilizarse para medir el alcance de la mineralización de la sustancia problema hasta convertirse en $CO_2$. La radiocromatografía (RAD-TLC) o la HPLC pueden utilizarse para analizar las concentraciones de las sustancias problema marcadas con $^{14}C$ y la formación de los productos de transformación mayoritarios (párrafo tercero del punto 1.8.9.4). Para que se pueda efectuar una estimación directa de la vida media, es necesaria la ausencia de productos de transformación mayoritarios (definidos como aquellos que representan individualmente una concentración $\geq$ 10 % de la cantidad aplicada de sustancia problema). En caso de presencia de productos de transformación mayoritarios, según se acaban de definir, es necesario proceder a una evaluación detallada de los datos. Aquí puede incluirse la repetición del ensayo o la identificación de los productos de transformación (véase el párrafo primero del punto 1.8.9.5) salvo que el destino de los productos de transformación pueda evaluarse razonablemente según la experiencia (por ejemplo, con información sobre la ruta de degradación). Como varía la proporción de carbono de la sustancia problema que se ha convertido en $CO_2$ (dependiendo en gran medida de la concentración de sustancia problema y de otros sustratos disponibles, de las condiciones del ensayo y de la comunidad microbiana), este ensayo no permite una estimación directa de la biodegradación final como en un ensayo de desaparición del COD, pero el resultado es similar al obtenido con un ensayo respirométrico. El grado de mineralización será así más o menos igual al nivel mínimo de biodegradación final. Para obtener una imagen más completa de la biodegradación final (mineralización e incorporación a la biomasa), debe realizarse al final del ensayo el análisis de la distribución en fases del $^{14}C$ (véase el apéndice 1). El $^{14}C$ presente en el conjunto de partículas consistirá en el $^{14}C$ incorporado a la biomasa bacteriana y en el $^{14}C$ adsorbido a partículas orgánicas.

2.3. VALIDEZ DEL ENSAYO

Si la sustancia de referencia no se degrada dentro del intervalo de tiempo previsto (en el caso de la anilina y del benzoato de sodio, normalmente menos de dos semanas), la validez del ensayo queda bajo sospecha y debe comprobarse posteriormente, o bien ha de repetirse el ensayo con otra muestra de agua. En un ensayo de intercalibración del método, organizado por la ISO y en el que participaron siete laboratorios situados en distintos puntos de Europa, las constantes de velocidad de degradación adaptadas de la anilina variaron entre 0,3 y 1,7 días$^{-1}$ con una media de 0,8 $d^{-1\ a\ 20\ ^oC}$ y un error estándar de ± 0,4 $d^{-1}$ ($t_{½}$ = 0,9 días). Los tiempos de latencia típicos estaban entre 1 y 7 días. Se informó de que las aguas examinadas tenían una biomasa bacteriana correspondiente a $10^3$ a $10^4$ unidades formadoras de colonias por ml. Las velocidades de degradación en las aguas ricas en nutrientes de Europa central eran mayores que en las aguas oligotróficas de los países nórdicos, lo que puede deberse a la diferente situación trófica o a alguna exposición previa a las sustancias.

La recuperación total (balance de masas) al final de experimento debe situarse entre el 90 y el 110 % en caso de sustancias radiomarcadas, mientras que la recuperación inicial al principio del experimento debe estar entre el 70 y el 110 % en caso de sustancias no marcadas. Sin embargo, estos intervalos deben interpretarse solo como objetivos y no utilizarse como criterios de aceptación del ensayo.

▼M1

3. **INFORME DEL ENSAYO**

El tipo de estudio, es decir, si es pelágico o con sedimento en suspensión, debe figurar claramente en el informe del ensayo, que también incluirá como mínimo la información siguiente:

Sustancias problema y de referencia:

— denominaciones comunes, nombres químicos (recomendados por la IUPAC o nombres CAS), números CAS, fórmulas estructurales (con indicación de la posición del $^{14}C$ si se utilizan sustancias radiomarcadas) y propiedades fisicoquímicas pertinentes de las sustancias problema y de referencia (véanse los puntos 1.5 y 1.6),

— nombres químicos, números CAS, fórmulas estructurales (con indicación de la posición del $^{14}C$ si se utilizan sustancias radiomarcadas) y propiedades fisicoquímicas pertinentes de las sustancias utilizadas como patrones para la identificación y cuantificación de los productos de transformación,

— pureza (impurezas) de las sustancias problema y de referencia,

— pureza radioquímica de la sustancia química marcada y actividad específica (si procede).

Aguas superficiales:

Debe aportarse como mínimo la siguiente información sobre la muestra de agua tomada:

— ubicación y descripción del lugar de muestreo, incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación,

— fecha y hora de la toma de muestras,

— nutrientes (N total, amonio, nitritos, nitratos, P total, ortofosfato disuelto),

— profundidad a la que se ha tomado la muestra,

— aspecto de la muestra (por ejemplo, color y turbidez),

— COD y COT,

— DBO,

— temperatura y pH en el lugar y a la hora de la recogida,

— potencial de oxígeno o redox (obligatorio si no es evidente el carácter aerobio de las condiciones),

— salinidad o conductividad (en caso de agua salina o salobre),

— sólidos en suspensión (en caso de muestra turbia),

— otra información que pueda ser de interés sobre el lugar de muestreo en el momento del mismo (por ejemplo, datos históricos o actuales sobre el caudal del río o corriente marítima, proximidad a vertidos importantes y tipo de vertidos, condiciones meteorológicas antes del momento del muestreo),

y, opcionalmente,

— biomasa microbiana (por ejemplo, recuento directo con naranja de acridina o unidades formadoras de colonias),

▼M1

— carbono inorgánico,

— concentración de clorofila a como estimación específica de la biomasa de algas.

Por otra parte, debe proporcionarse la información siguiente sobre el sedimento cuando se realice un ensayo con sedimento en suspensión:

— profundidad a la que se ha tomado el sedimento,

— aspecto del sedimento (por ejemplo, coloreado, fangoso, limoso o arenoso),

— textura (por ejemplo, porcentaje de arena gruesa, arena fina, limo y arcilla),

— peso seco en g/l de los sólidos en suspensión, concentración de COT o pérdida de peso por calcinación como medida del contenido de materia orgánica,

— pH,

— potencial de oxígeno o redox (obligatorio si no es evidente el carácter aerobio de las condiciones).

Condiciones de ensayo:

— tiempo transcurrido entre la recogida y la utilización en el ensayo de laboratorio, conservación y tratamiento previo de la muestra, fechas de realización de los estudios,

— cantidad de sustancia problema aplicada, concentración de ensayo y sustancia de referencia,

— método de aplicación de la sustancia problema, incluido el eventual uso de disolventes,

— volumen de agua superficial utilizada y de sedimento (en su caso), y volumen de las muestras tomadas para su análisis en cada intervalo,

— descripción del sistema de ensayo utilizado.

Si no debe mantenerse la oscuridad, información sobre las condiciones de «luz difusa»;

— información sobre los métodos utilizados para establecer los controles de esterilidad (por ejemplo, temperatura, tiempo y número de tratamientos en autoclave),

— temperatura de incubación,

— información sobre técnicas analíticas y métodos utilizados para mediciones radioquímicas y supervisión del balance de masas, así como mediciones de la distribución en fases (en su caso),

— número de réplicas.

Resultados:

— porcentajes de recuperación (véase el punto 1.7.1),

— repetibilidad y sensibilidad de los métodos de análisis utilizados, incluido el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOC) (véase el punto 1.7.2),

▼**M1**

— todos los datos medidos (incluidos los tiempos de muestreo) y los valores calculados en forma tabular, así como las curvas de degradación; respecto a cada concentración de ensayo y cada uno de los matraces replicados, debe indicarse el coeficiente de correlación lineal de la pendiente de la representación logarítmica, el tiempo de latencia estimado y la constante de velocidad de primer o de pseudoprimer orden (a ser posible), así como la vida media de degradación correspondiente (o el período de vida media, $t_{50}$),

— valores importantes como medias de los resultados observados en las distintas réplicas, por ejemplo, la duración del tiempo de latencia, la constante de velocidad de degradación y la vida media de degradación (o el $t_{50}$),

— categorización del sistema como adaptado o no adaptado, según el aspecto de la curva de degradación y la posible influencia de la concentración de ensayo,

— resultados de la supervisión del balance de masa final y resultados de las mediciones de la distribución en fases (en su caso),

— fracción de $^{14}C$ mineralizado y, si se hacen análisis específicos, nivel final de la degradación primaria,

— identificación, concentración molar y porcentaje de los productos aplicados y de los de transformación mayoritarios (véase el párrafo primero del punto 1.8.9.5), cuando proceda,

— vía de transformación propuesta, si procede,

— discusión de los resultados.

4. **BIBLIOGRAFÍA**

(1) OECD TG 309 (2004). Aerobic Mineralisation in surface water — Simulation Biodegradation Test.

(2) ISO/DIS 14592-1 (1999). Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations — Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

(3) Método de ensayo C.23. Transformación aerobia y anaerobia en el suelo.

(4) Método de ensayo C.24. Transformación aerobia y anaerobia en sistemas de sedimentos acuáticos.

(5) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, París.

(6) ISO 8245 (1999). Water quality — Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

(7) ISO 10634 (1995). Water quality — Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

(8) OECD (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 22.

▼**M1**

(9) Simkins, S., y Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol. 47, 394-401.

(10) Ingerslev, F., y N. Nyholm (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of $^{14}C$-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274-283.

(11) ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 — Report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼M1

*Apéndice 1*

**Distribución en fases del $^{14}C$**

Para supervisar el procedimiento, las mediciones normales de la actividad de $^{14}C$ orgánico total residual (AOT) deben complementarse con mediciones del balance de masa mediante determinación directa del $^{14}CO_2$ formado previa retención en un absorbente (véase el apéndice 3). El mero hecho de que se forme $^{14}CO_2$ es en sí una prueba directa de biodegradación, frente a la degradación abiótica u otros mecanismos de pérdida, como la volatilización y la adsorción. Es posible obtener información adicional útil sobre las características de biodegradabilidad a partir de mediciones de la distribución de la AOT entre el estado disuelto (actividad de $^{14}C$ orgánico disuelto, AOD) y en partículas (actividad de $^{14}C$ orgánico en partículas, AOP) previa separación de las partículas mediante filtración por membrana o centrifugación. La AOP se refiere a la sustancia problema adsorbida en la biomasa microbiana o en otras partículas, además del carbono de la sustancia problema que se haya utilizado en la síntesis de nuevo material celular y, por tanto, se haya incorporado a la fracción particulada de la biomasa. La formación de material orgánico con $^{14}C$ disuelto puede estimarse como la AOD al final de la biodegradación (meseta en la curva degradación-tiempo).

La distribución en fases del $^{14}C$ residual en muestras elegidas se estima pasando las muestras por un filtro de membrana de 0,22 μm o 0,45 μm, procurando que el filtro sea de un material que no adsorba cantidades significativas de sustancia problema (pueden ser adecuados los filtros de policarbonato). Si la sorción de sustancia problema en el filtro es demasiado importante como para despreciarla (este extremo se ha de comprobar antes de que se efectúe el experimento), puede sustituirse la filtración por centrifugación a elevada velocidad (2 000 g; 10 min).

El filtrado o centrifugado se trata como se describe en el apéndice 3 respecto a las muestras sin filtrar. Los filtros de membrana se disuelven en un líquido de centelleo adecuado y se hace el recuento normalmente, en principio utilizando solo el método de la proporción con el patrón externo para corregir la atenuación, o bien se utiliza un oxidante de la muestra. Si se ha recurrido a la centrifugación, el precipitado de las partículas se vuelve a suspender en 1-2 ml de agua destilada y se pasa a un frasco de centelleo. Después se lava dos veces con 1 ml de agua destilada y el agua utilizada se pasa al frasco. En caso necesario, la suspensión puede incorporarse a un gel para recuento de centelleo líquido.

▼M1

*Apéndice 2*

**Procedimiento semicontinuo**

Puede ser necesario prolongar la incubación hasta varios meses para conseguir una degradación suficiente de sustancias persistentes. La duración del ensayo no debe pasar en principio de 60 días, salvo que se mantengan las características de la muestra original de agua mediante la renovación de la suspensión de ensayo. Sin embargo, si en los primeros 60 días se ha iniciado la degradación de la sustancia problema, la duración del ensayo puede ampliarse hasta un máximo de 90 días sin renovación de la suspensión de ensayo.

Si la incubación dura mucho tiempo, la diversidad de la comunidad microbiana puede verse reducida por diversos mecanismos de pérdida y por el posible agotamiento de nutrientes esenciales y sustratos primarios de carbono en la muestra de agua. Por tanto, se recomienda efectuar un ensayo semicontinuo para determinar adecuadamente la velocidad de degradación de las sustancias que se degradan lentamente. El ensayo debe iniciarse con un procedimiento semicontinuo si, en función de la experiencia previa, se espera que sea necesario un período de incubación de tres meses para lograr una degradación del 20 % de la sustancia. Otra posibilidad es pasar el ensayo discontinuo normal a ensayo semicontinuo si al cabo de unos 60 días de seguir el procedimiento discontinuo no se aprecia ninguna degradación de la sustancia problema. Puede pararse el procedimiento semicontinuo y seguir el experimento como experimento discontinuo cuando se haya registrado una degradación sustancial (por ejemplo, > 20 %).

En el ensayo semicontinuo, cada dos semanas se sustituye un tercio aproximadamente del volumen de la suspensión de ensayo por agua recién recogida con la sustancia problema añadida a la concentración inicial. Análogamente, si se efectúa el ensayo opcional con sedimento en suspensión, al agua de sustitución se le añade sedimento a la concentración inicial (entre 0,01 y 1 g/l). Cuando se realiza el ensayo con sedimento sólido en suspensión, es importante que se mantenga el sistema totalmente en suspensión también durante la renovación del agua, y que el tiempo de residencia sea el mismo para los sólidos y para el agua, ya que en caso contrario podría perderse la deseada similitud con un sistema acuoso homogéneo sin fases fijas. Por estos motivos, se prefiere que, cuando se utilice un procedimiento semicontinuo, la concentración inicial de sedimentos en suspensión se sitúe en la banda baja del intervalo especificado.

La adición prescrita de sustancia problema implica que la concentración inicial de sustancia problema no se vea superada por la renovación parcial de la suspensión de ensayo y, por tanto, se evite la adaptación que se encuentra frecuentemente con concentraciones elevadas de sustancia problema. Como el procedimiento incluye tanto una reinoculación como una compensación de los nutrientes y sustratos primarios agotados, se restablece la diversidad microbiana original y la duración del ensayo puede prolongarse, en principio indefinidamente. Cuando se utiliza el procedimiento semicontinuo, es importante observar que la concentración residual de la sustancia problema debe corregirse para tener en cuenta las cantidades de sustancia problema añadidas y eliminadas en cada operación de renovación. Si el compuesto se adsorbe, las concentraciones de sustancia problema total y disuelta serán intercambiables. La sorción es despreciable (< 5 %) en las condiciones especificadas (0,1 a 1 g sólidos/l) en caso de sustancias de log $K_{ow}$ < 3 (válido para compuestos neutros y lipófilos). Esto queda ilustrado con el siguiente ejemplo de cálculo. 0,1 g/l de sólidos corresponden aproximadamente a 10 mg de carbono por litro (fracción de carbono, $f_C$ = 0,01). Si se acepta que:

log $K_{ow}$ (de la sustancia problema) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

coeficiente de reparto, $K_d = f_C \times K_{oc}$,

entonces, la fracción disuelta de la concentración total [C-agua ($C_w$)/C-total ($C_t$)] es:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

*Apéndice 3*

## Determinación del $^{14}CO_2$

### Determinación indirecta del $^{14}CO_2$

Para las mediciones normales, el método indirecto suele ser el que menos tiempo exige y el más preciso, si la sustancia problema no es volátil ni se transforma en productos volátiles. Se transfieren simplemente muestras sin filtrar de, por ejemplo, 5 ml a frascos de centelleo. Es adecuada una actividad inicial en las muestras de 5 000 dpm a 10 000 dpm (80 a 170 Bq), y la actividad inicial mínima es de unas 1 000 dpm. El $CO_2$ debe eliminarse tras acidificar hasta un pH de 2-3 con 1 a 2 gotas de $H_3PO_4$ o HCl concentrado. La eliminación del $CO_2$ puede efectuarse burbujeando aire durante aproximadamente 30 min o 1 hora. Otra posibilidad consiste en agitar enérgicamente los frascos durante 1 a 2 horas (por ejemplo, en un agitador de microplacas), o bien agitarlos más suavemente hasta el día siguiente. Debe comprobarse la eficacia del procedimiento de eliminación del $CO_2$, prolongando el período de aireación o de agitación. A continuación se añade un líquido de centelleo adecuado para el recuento de muestras acuosas, se homogeneiza la muestra con un mezclador de torbellino y se determina la radiactividad mediante recuento de centelleo líquido, restando la actividad de fondo observada en los ensayos en blanco ($F_B$). Salvo que el agua de ensayo sea muy coloreada o contenga una elevada concentración de partículas, las muestras exhibirán normalmente una atenuación uniforme y será suficiente efectuar una corrección de la atenuación utilizando un patrón externo. Si el agua de ensayo está muy coloreada, puede ser necesario corregir la atenuación mediante la adición de un patrón interno. Si la concentración de partículas es elevada, puede que no sea viable obtener una solución o un gel homogéneos, o que la variación de la atenuación entre las muestras sea grande. En tal caso, podrá utilizarse el método de recuento descrito más abajo para el ensayo de lodos. Si el ensayo se realiza como ensayo de sedimento en suspensión, la medición del $^{14}CO_2$ podría hacerse indirectamente tomando una muestra homogénea de 10 ml de la suspensión o agua de ensayo y separando las fases mediante centrifugación a una velocidad adecuada (por ejemplo, a 40 000 $m/s^2$ durante 15 min). La fase acuosa se trataría a continuación como se describe más arriba. La actividad de $^{14}C$ en la fase particulada (AOP) debe determinarse volviendo a suspender el sedimento en un pequeño volumen de agua destilada, transfiriendo esta suspensión a frascos de centelleo y añadiendo líquido de centelleo para formar un gel (se encuentran líquidos de centelleo especiales para este fin). Según la naturaleza de las partículas (por ejemplo, su contenido en materia orgánica), puede ser factible digerir la muestra hasta el día siguiente con un solubilizador de tejidos y homogeneizar después con un mezclador de torbellino antes de añadirle líquido de centelleo. Otra posibilidad consiste en determinar la AOP mediante combustión en exceso de oxígeno utilizando un oxidante de la muestra. Para hacer el recuento, deben incluirse siempre patrones internos, y puede ser necesario efectuar correcciones de la atenuación añadiendo patrones internos a cada una de las muestras.

### Determinación directa del $^{14}CO_2$

Si se mide directamente el $^{14}CO_2$ formado, debe hacerse poniendo más matraces al inicio del ensayo; los matraces de ensayo se recogen a cada tiempo de medición, se acidifican hasta un pH de 2-3 y se recoge el $^{14}CO_2$ con un absorbente interno (colocado en cada matraz al principio del ensayo) o externo. Como medio absorbente puede utilizarse un álcali (por ejemplo, solución de NaOH 1 N, o una lenteja de NaOH), etanolamina o un absorbente a base de etanolamina, o algún absorbente disponible en el comercio. Si se recurre a la medición directa del $^{14}CO_2$, los matraces deben estar cerrados con, por ejemplo, diafragmas de caucho butílico.

▼**M1**

*Figura 1a*

**Ejemplo de representación aritmética de los datos (actividad residual frente al tiempo)**

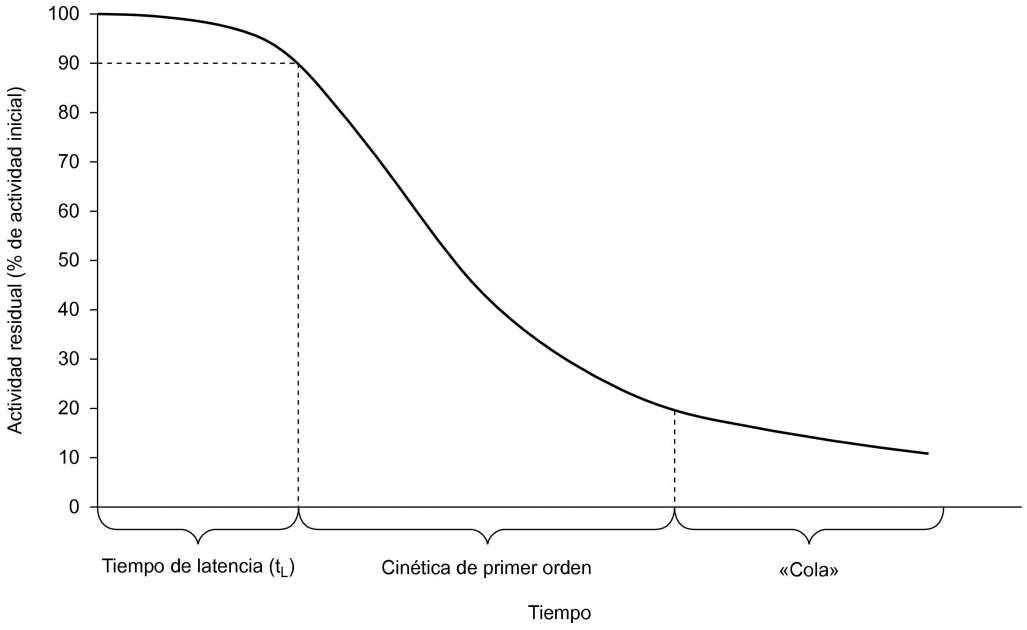
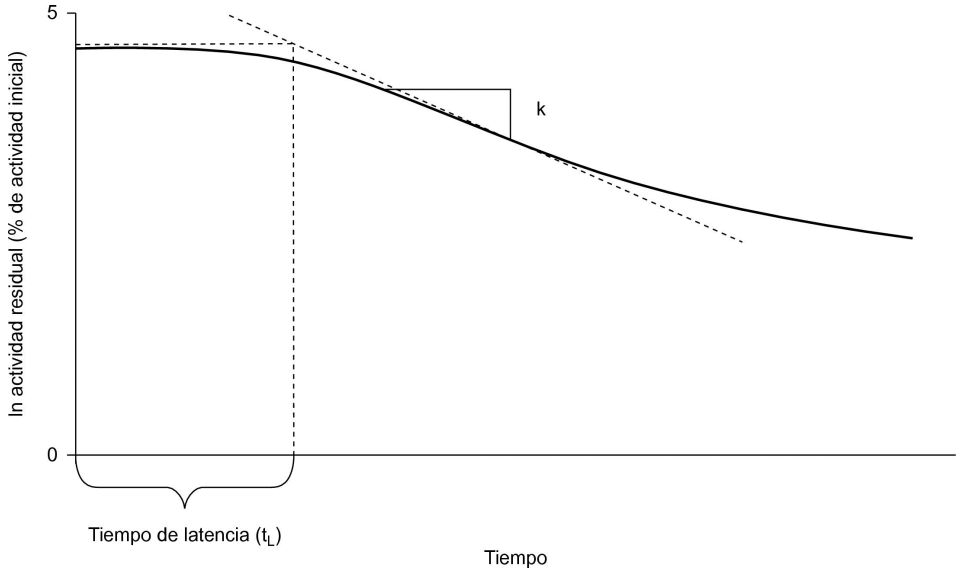



*Figura 1b*

**Ejemplo de representación semilogarítmica de los datos (ln de la actividad residual frente al tiempo)**



▼M6

## C.26. PRUEBA DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *LEMNA* SPP.

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 221 (2006). Está diseñado para evaluar la toxicidad de las sustancias para las plantas de agua dulce del género *Lemna* (lenteja de agua). Se basa en métodos anteriores (1)(2)(3)(4)(5)(6), pero incluye modificaciones de tales métodos para tener en cuenta los resultados de recientes investigaciones y consultas sobre diversos aspectos fundamentales. El método de ensayo se ha validado mediante un ensayo interlaboratorios internacional (7).

2. Este método describe el ensayo de toxicidad con *Lemna gibba* y *Lemna minor*, dos especies que han sido estudiadas ampliamente y son objeto de las normas arriba citadas. La taxonomía de *Lemna* spp. es difícil y se ve complicada por la existencia de una amplia gama de fenotipos. Aunque puede aparecer variabilidad genética en la respuesta de *Lemna* a los agentes tóxicos, actualmente no se tienen datos suficientes sobre esta fuente de variabilidad como para recomendar el uso de un clon determinado en el presente método de ensayo. Ha de señalarse que el ensayo no se realiza en condiciones axénicas, pero se toman medidas en distintas fases del procedimiento del ensayo para reducir al mínimo la contaminación por otros organismos.

3. Se incluyen pormenores de los ensayos con renovación (semiestáticos y dinámicos) y sin renovación (estáticos) de la solución de ensayo. En función de los objetivos del ensayo y de las imposiciones normativas, se recomienda considerar la aplicación de métodos semiestáticos y dinámicos, por ejemplo en caso de sustancias que desparezcan rápidamente de la solución por volatilización, fotodegradación, precipitación o biodegradación. En la referencia (8) se dan más orientaciones.

4. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

5. Se cultivan plantas del género *Lemna* en fase de crecimiento exponencial como monocultivos expuestos a diferentes concentraciones de la sustancia problema durante un plazo de siete días. El objetivo del ensayo es cuantificar los efectos relacionados con la sustancia sobre el crecimiento vegetativo a lo largo de este plazo, a partir de la evaluación de unas variables de medición seleccionadas. La variable de medición primaria es el número de frondas. Se mide también al menos otra variable de medición (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco), ya que algunas sustancias pueden afectar a otras variables de medición mucho más que al número de frondas. Para cuantificar los efectos relacionados con la sustancia, se compara el crecimiento en las soluciones de ensayo con el de los controles y se determina la concentración que ocasiona una inhibición del crecimiento de un porcentaje especificado (por ejemplo, 50 %), la cual se expresa como $EC_x$ (por ejemplo, $EC_{50}$).

6. El parámetro del ensayo es la inhibición del crecimiento, expresado como incremento logarítmico de la variable de medición (tasa media de crecimiento específico) durante el tiempo de exposición. A partir de las tasas medias de crecimiento específico registradas en una serie de soluciones de ensayo, se determina la concentración que produce una inhibición especificada del x % de la tasa de crecimiento (por ejemplo, del 50 %) y se expresa como $E_rC_x$ (por ejemplo, $E_rC_{50}$).

7. Otra variable de respuesta utilizada en este método de ensayo es el rendimiento, lo que puede ser necesario en algunos países para cumplir obligaciones específicas derivadas de la normativa. Se define como el valor de las variables de medición al final del tiempo de exposición menos el valor de las variables de medición al inicio de este tiempo. A partir del rendimiento registrado en una serie de soluciones de ensayo, se determina la concentración que produce una inhibición especificada del x % del rendimiento (por ejemplo, del 50 %) y se expresa como $E_yC_x$ (por ejemplo, $E_yC_{50}$).

▼M6

8. Además, pueden determinarse estadísticamente la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y la concentración sin efecto observado (NOEC).

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

9. Debe contarse con un método analítico que tenga la sensibilidad adecuada para cuantificar la sustancia en el medio de ensayo.

10. Entre la información sobre la sustancia problema que puede ser útil para establecer las condiciones del ensayo están los siguientes datos: fórmula estructural, pureza, hidrosolubilidad, estabilidad en el agua y a la luz, $pK_a$, $K_{ow}$, presión de vapor y biodegradabilidad. La hidrosolubilidad y la presión de vapor pueden utilizarse para calcular la constante de la ley de Henry, que indicará la probabilidad de la pérdida de cantidades significativas de sustancia problema durante el tiempo del ensayo. Esto contribuirá a indicar si deben tomarse medidas particulares para limitar tal pérdida. Cuando sea dudosa la información sobre la solubilidad y estabilidad de la sustancia problema, se recomienda que se evalúen dichos aspectos en las condiciones del ensayo, es decir, con el medio de cultivo, la temperatura y el régimen de iluminación que se vayan a utilizar en el ensayo.

11. Cuando sea particularmente importante el control del pH del medio de ensayo, por ejemplo cuando se estudien metales o sustancias hidrolíticamente inestables, se recomienda añadir un amortiguador al medio de cultivo (véase el punto 21). En la referencia (8) se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan estos ensayos.

VALIDEZ DEL ENSAYO

12. Para que el ensayo sea válido, el tiempo de duplicación del número de frondas en el control debe ser inferior a 2,5 días (60 h), lo que corresponde a una multiplicación por siete en el plazo de siete días y a una tasa media de crecimiento específico de 0,275 $d^{-1}$. Con los medios y condiciones de ensayo descritos en el presente método, este criterio puede cumplirse utilizando un régimen estático (5). También se prevé que este criterio se pueda cumplir en condiciones semiestáticas y dinámicas. En el punto 49 se muestra cómo calcular el tiempo de duplicación.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

13. Para comprobar el procedimiento del ensayo pueden someterse a ensayo una o varias sustancias de referencia, como el 3,5-diclorofenol utilizado en el ensayo interlaboratorios internacional (7). Se recomienda efectuar un ensayo con una sustancia de referencia al menos dos veces al año o, si la frecuencia de los ensayos es menor, en paralelo con la determinación de la toxicidad de una sustancia problema.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

14. Todo el equipo que entre en contacto con los medios de ensayo será de vidrio o de otro material químicamente inerte. El material de vidrio utilizado para el cultivo y el ensayo estará limpio de contaminantes químicos que puedan pasar al medio de ensayo y además será estéril. Los recipientes de ensayo tendrán la anchura suficiente para que las frondas de las diferentes colonias de los recipientes de control puedan crecer sin solaparse al final del ensayo. No importa si las raíces tocan el fondo de los recipientes de ensayo, pero se recomienda una profundidad mínima de 20 mm y un volumen mínimo de 100 ml en cada recipiente de ensayo. Siempre que se respeten estas normas, no es fundamental el tipo de recipiente de ensayo. Se ha visto que son válidos tanto los vasos de precipitados como los cristalizadores o las placas Petri de vidrio de dimensiones adecuadas. Los recipientes de ensayo

▼M6

estarán cubiertos para minimizar la evaporación y la contaminación accidental, pero sin impedir el necesario intercambio de gases. Los recipientes de ensayo y, en particular, las tapas serán tales que eviten la formación de sombras o la modificación de las características espectrales de la luz.

15. No se tendrán juntos los cultivos y los recipientes de ensayo, y la mejor forma de conseguirlo es utilizar cámaras, incubadoras o salas de cultivo aparte. Debe ser posible regular la iluminación y la temperatura, y mantenerlas a nivel constante (véanse los puntos 35-36).

**Organismo de ensayo**

16. El organismo utilizado para este ensayo es *Lemna gibba* o *Lemna minor*. En el apéndice 2 se recogen breves descripciones de especies de lenteja de agua que se han utilizado en ensayos de toxicidad. El material vegetal puede obtenerse de una colección de cultivos, de otro laboratorio o del campo. Si se recogen del campo, las plantas deben mantenerse cultivadas en el mismo medio que se vaya a utilizar para el ensayo al menos en las ocho semanas anteriores a esta utilización. Los lugares del campo utilizados para recoger los cultivos iniciales deben estar libres de fuentes de contaminación evidentes. Si se obtienen de otro laboratorio o de una colección de cultivos, los cultivos deben mantenerse similarmente durante un mínimo de tres semanas. En el informe han de indicarse siempre el origen, la especie y el clon (si se conoce) del material vegetal utilizado para el ensayo.

17. Deben utilizarse monocultivos que estén claramente exentos de contaminación con otros organismos, como algas o protozoos. Las plantas sanas de *L. minor* consisten en colonias formadas por entre dos y cinco frondas, mientras que las colonias sanas de *L. gibba* pueden tener hasta siete frondas.

18. La calidad y la uniformidad de las plantas empleadas en el ensayo tendrán una influencia significativa sobre el resultado del mismo, por lo que deben seleccionarse con cuidado. Han de utilizarse plantas jóvenes, en fase de crecimiento rápido, que no presenten lesiones visibles ni cambios de color (clorosis). La buena calidad de un cultivo viene indicada por una elevada frecuencia de colonias con un mínimo de dos frondas. Un gran número de frondas aisladas indica tensión ambiental como, por ejemplo, limitación de nutrientes, y el material vegetal de estos cultivos no debe utilizarse en los ensayos.

**Cultivo**

19. Para reducir la frecuencia del mantenimiento del cultivo (por ejemplo, cuando no esté previsto efectuar ensayos con *Lemna* durante cierto tiempo), es posible mantener los cultivos en condiciones de iluminación y temperatura reducidas (4 a 10 °C). En el apéndice 3 se recoge información sobre el mantenimiento de los cultivos. La presencia de signos evidentes de contaminación por algas u otros organismos puede hacer necesaria la esterilización superficial de una submuestra de frondas de *Lemna*, seguida por su transferencia a medio fresco (véase el apéndice 3). En tal caso, se desechará el resto del cultivo contaminado.

20. Al menos siete días antes del ensayo, debe transferirse asépticamente a medio estéril fresco un número suficiente de colonias, que se cultivarán durante 7 a 10 días en las condiciones del ensayo.

**Medio de ensayo**

21. Se recomienda el uso de medios diferentes para *Lemna minor* y *Lemna gibba*, como se describe más abajo. Debe estudiarse cuidadosamente la inclusión de un amortiguador de pH en el medio de ensayo [ácido 4-morfolinopropano-sulfónico (MOPS), nº CAS 1132-61-2) en medio de *L. minor*, y $NaHCO_3$ en medio de *L. gibba*] si se sospecha que puede reaccionar con la sustancia problema e influir en la expresión de su toxicidad. También es aceptable el medio de Steinberg (9), siempre que se cumplan los criterios de validez.

▼M6

22. Para el cultivo de *L. minor* y los ensayos con ella, se recomienda una modificación del medio de cultivo normal de Suecia (SIS) para *Lemna*, cuya composición figura en el apéndice 4.

23. Para el cultivo de *L. gibba* y los ensayos con ella, se recomienda el medio de cultivo 20X — AAP, tal como se describe en el apéndice 4.

24. El medio de Steinberg, como se describe en el apéndice 4, es también adecuado para *L. minor*, aunque puede utilizarse asimismo con *L. gibba* siempre que se cumplan los criterios de validez.

**Soluciones de ensayo**

25. Las soluciones de ensayo se preparan normalmente diluyendo una solución madre. En principio, las soluciones madre de la sustancia problema se preparan disolviendo la sustancia en medio de cultivo.

26. La mayor concentración estudiada de la sustancia problema no debe superar como norma su hidrosolubilidad en las condiciones de ensayo. No obstante, ha de señalarse que *Lemna* spp. flota en la superficie y puede exponerse a sustancias que se acumulan en la interfase agua-aire (por ejemplo, sustancias hidrofóbicas o poco hidrosolubles, o sustancias tensioactivas). En tales circunstancias, habrá exposición debida a material que no está disuelto y las concentraciones de ensayo podrán superar la hidrosolubilidad, según las características de la sustancia problema. En caso de sustancias problema de escasa hidrosolubilidad, puede ser necesario preparar una dispersión o solución madre concentrada de la sustancia con un dispersante o disolvente orgánico para facilitar la adición de cantidades exactas de la sustancia problema al medio de ensayo y ayudar a su dispersión y disolución. No obstante, debe evitarse en la mayor medida posible el empleo de tales materiales. El uso de disolventes o dispersantes auxiliares no debe provocar fitotoxicidad. Por ejemplo, entre los disolventes utilizados frecuentemente que no causan fitotoxicidad a concentraciones de hasta 100 µl/l figuran la acetona y la dimetilformamida. Si se utiliza un disolvente o dispersante, su concentración final se indicará en el informe y se mantendrá a un nivel mínimo ($\leq$ 100 µl/l), y todos los recipientes de tratamiento y de control contendrán la misma concentración de disolvente o dispersante. En la referencia (8) se da más información sobre el uso de dispersantes.

**Grupos de ensayo y controles**

27. Para seleccionar las concentraciones de ensayo adecuadas es útil disponer de datos anteriores sobre la toxicidad de la sustancia problema para *Lemna*, como, por ejemplo, datos procedentes de un ensayo de determinación del intervalo. En el ensayo definitivo de toxicidad deben emplearse al menos cinco concentraciones de ensayo dispuestas en progresión geométrica. Lo mejor es que la razón entre las concentraciones de ensayo no sea más de 3,2, pero puede utilizarse un valor superior si la curva concentración-respuesta es plana. Si se usan menos de cinco concentraciones, hay que justificarlo. De cada concentración de ensayo se utilizarán al menos tres réplicas en paralelo.

28. Al fijar el abanico de concentraciones de ensayo (para el ensayo de determinación del intervalo o para el ensayo definitivo de toxicidad), debe tenerse en cuenta lo siguiente:

— Para determinar una $EC_x$, es necesario que las concentraciones de ensayo abarquen el valor de $EC_x$ a fin de asegurar un nivel adecuado de confianza. Por ejemplo, si se estima la $EC_{50}$, la mayor concentración de ensayo debe ser superior al valor de $EC_{50}$. Si el valor de $EC_{50}$ se encuentra fuera del intervalo de las concentraciones de ensayo, los intervalos de confianza asociados serán amplios y quizá no sea posible efectuar una evaluación adecuada del ajuste estadístico del modelo.

— Si el objetivo es estimar la LOEC/NOEC, la menor concentración de ensayo debe ser tan baja que el crecimiento correspondiente no sea significativamente inferior al del control. Por otra parte, la mayor concentración de ensayo debe ser tan alta que el crecimiento correspondiente sea significativamente inferior al del control. Si no es así, habrá que

▼M6

repetir el ensayo utilizando un intervalo diferente de concentraciones (salvo que la mayor concentración sea el límite de solubilidad o la concentración límite requerida máxima, por ejemplo 100 mg/l).

29. Cada ensayo debe incluir controles con un medio nutritivo, número de frondas y colonias, condiciones ambientales y procedimientos iguales que los de los recipientes de ensayo, pero sin la sustancia problema. Si se utiliza un disolvente o dispersante auxiliar, se incluirá un control adicional con el disolvente o dispersante presente en la misma concentración que en los recipientes con la sustancia problema. El número de réplicas de los recipientes de control (y recipientes de disolventes, en su caso) será al menos igual al número de recipientes utilizados con cada concentración de ensayo, y preferentemente el doble de este número.

30. Si no es necesario determinar la NOEC, el diseño del ensayo puede modificarse para aumentar el número de concentraciones y reducir el número de réplicas por concentración. Sin embargo, el número de réplicas de los controles será al menos de tres.

**Exposición**

31. Se transfieren desde el cultivo de inóculo colonias formadas por entre 2 y 4 frondas visibles, repartiéndose aleatoriamente entre los recipientes de ensayo en condiciones asépticas. Cada recipiente de ensayo debe contar con un total de 9 a 12 frondas. En cada uno de ellos habrá el mismo número de frondas y colonias. La experiencia obtenida con este método y los datos del ensayo interlaboratorios indican que el uso de tres réplicas por tratamiento, contando cada una de ellas inicialmente con entre 9 y 12 frondas, es suficiente para detectar diferencias en el crecimiento del orden del 4 al 7 % de la inhibición calculada en tasa de crecimiento (del 10 al 15 % calculada en rendimiento) entre tratamientos (7).

32. Es necesario un diseño aleatorio de la distribución de los recipientes de ensayo en la incubadora para minimizar la influencia de las diferencias espaciales de intensidad luminosa o temperatura. También es necesario un diseño en bloques o una redistribución aleatoria de los recipientes cuando se hacen observaciones (o una redistribución más frecuente).

33. Si un ensayo preliminar de estabilidad indica que la concentración de sustancia problema no puede mantenerse (es decir, que la concentración medida cae por debajo del 80 % de la concentración medida inicialmente) a lo largo de la duración del ensayo (7 días), se recomienda un régimen de ensayo semiestático. En tal caso, las colonias deben exponerse a soluciones de ensayo y control recién preparadas en al menos dos ocasiones durante el ensayo (por ejemplo, en los días 3 y 5). La frecuencia de la exposición al medio fresco dependerá de la estabilidad de la sustancia problema; puede ser necesaria una frecuencia mayor para mantener concentraciones cuasiconstantes de sustancias muy inestables o volátiles. En ciertas circunstancias puede hacer falta un procedimiento dinámico (8)(10).

34. La posibilidad de exposición mediante aplicación foliar (aerosol) no se contempla en el presente método de ensayo; véase en cambio la referencia (11).

**Condiciones de incubación**

35. Debe utilizarse continuamente una luz fluorescente blanca fría o cálida que dé una intensidad luminosa seleccionada en el intervalo de 85 a 135 $\mu E \cdot m^{-2}s^{-1}$ cuando se mide en una radiación activa para la fotosíntesis (400 a 700 nm) en puntos situados a la misma distancia de la fuente luminosa que las frondas de *Lemna* (equivalente a entre 6 500 y 10 000 lux). Las eventuales diferencias respecto a la intensidad luminosa seleccionada no deben

▼M6

superar el ± 15 % en toda la superficie de ensayo. El método de detección y medición de la luz, en particular el tipo de sensor, influye en el valor medido. La utilización de sensores esféricos (que responden a la luz desde todos los ángulos por encima y por debajo del plano de medición) y de sensores de «coseno» (que responden a la luz desde todos los ángulos por encima del plano de medición) es mejor que la de sensores unidireccionales, y proporciona lecturas más elevadas con una fuente luminosa multipuntual del tipo que se describe aquí.

36. La temperatura de los recipientes de ensayo debe ser de 24 ± 2 °C. El pH del medio de control no debe subir más de 1,5 unidades durante el ensayo. Sin embargo, una desviación superior a 1,5 unidades no invalida el ensayo si puede demostrarse que se cumplen los criterios de validez. Es necesario prestar atención particular a la deriva del pH en casos especiales, como cuando se estudian metales o sustancias inestables. En la referencia (8) puede encontrarse más información al respecto.

**Duración**

37. El ensayo termina a los siete días de la transferencia de las plantas a los recipientes de ensayo.

**Mediciones y determinaciones analíticas**

38. Al inicio del ensayo, se cuenta y registra el número de frondas de los recipientes de ensayo, velando por tener en cuenta las frondas prominentes y claramente visibles. Es necesario determinar el número de frondas de aspecto normal o anormal al inicio del ensayo, al menos una vez cada tres días durante el plazo de exposición (es decir, al menos dos veces durante el período de 7 días) y al final del ensayo. Deben anotarse los cambios observados en el desarrollo de las plantas como, por ejemplo, en el tamaño, aspecto, indicación de necrosis, clorosis o protuberancias, rotura de colonias o pérdida de flotabilidad de las frondas, así como en la longitud y aspecto de las raíces. Deben registrarse también las características significativas del medio de ensayo (por ejemplo, presencia de material sin disolver o crecimiento de algas en el recipiente de ensayo).

39. Además del recuento del número de frondas durante el ensayo, hay que evaluar los efectos de la sustancia problema sobre una o más de las siguientes variables de medición:

i) superficie total de las frondas;

ii) peso seco;

iii) peso fresco.

40. La superficie total de las frondas tiene la ventaja de que puede determinarse en cada recipiente de ensayo y de control al principio y al final del ensayo, así como durante el mismo. El peso seco o fresco debe determinarse al principio del ensayo a partir de una muestra de cultivo de inóculo representativa del utilizado para empezar el ensayo, y al final de este con el material vegetal de cada recipiente de ensayo y de control. Si no se mide la superficie de las frondas, es mejor determinar el peso seco que el peso fresco.

41. La superficie total de las frondas, el peso seco y el peso fresco pueden determinarse de la forma siguiente:

i) *Superficie total de las frondas:* La superficie total de las frondas de todas las colonias puede determinarse por análisis de imágenes. Puede captarse el contorno del recipiente de ensayo y de las plantas mediante una cámara de vídeo (es decir, poniendo el recipiente en una caja de luz), y después se digitaliza la imagen resultante. A continuación puede determinarse la superficie total de las frondas de un recipiente de ensayo calibrando con plantillas de superficie conocida. Debe procurarse evitar las interferencias debidas al borde del recipiente de ensayo. Otra posibilidad, pero más laboriosa, consiste en fotografiar los recipientes de ensayo y las plantas, recortar el contorno obtenido de las colonias y determinar su superficie mediante un analizador de superficie de hojas o papel milimetrado. También pueden ser adecuadas otras técnicas (por ejemplo, el cociente entre el peso del papel correspondiente a la superficie del contorno de las colonias y el de la superficie unitaria).

▼**M6**

ii) *Peso seco:* Se recogen todas las colonias de cada uno de los recipientes de ensayo y se lavan con agua destilada o desionizada. Se secan con material absorbente para eliminar el exceso de agua y después se calientan a 60 °C hasta llegar a peso constante. Deben incluirse los eventuales fragmentos de raíces. El peso seco se expresará con una precisión mínima de 0,1 mg.

iii) *Peso fresco:* Todas las colonias se transfieren a tubos de poliestireno (u otro material inerte), pesados previamente, con pequeños agujeros (de 1 mm) en los fondos redondeados. A continuación se centrifugan los tubos a 3 000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se vuelven a pesar los tubos, que contienen las colonias ahora secadas, y el peso fresco se calcula restando el peso del tubo vacío.

Frecuencia de las mediciones y determinaciones analíticas

42. Si se utiliza un diseño de ensayo estático, debe medirse el pH de cada tratamiento al inicio y al final del ensayo. Si el ensayo es semiestático, el pH debe medirse en cada lote de solución de ensayo «fresca» antes de cada renovación y también en las correspondientes soluciones «gastadas».

43. Debe medirse la intensidad luminosa en la cámara, incubadora o sala de cultivo, en puntos situados a la misma distancia de la fuente luminosa que las frondas de *Lemna*. Esta medición debe efectuarse al menos una vez durante el ensayo. Debe registrarse al menos una vez al día la temperatura del medio en un recipiente indicador mantenido en las mismas condiciones en la cámara, incubadora o sala de cultivo.

44. Las concentraciones de la sustancia problema se determinan durante el ensayo a intervalos adecuados. Con ensayos estáticos, el requisito mínimo es determinar las concentraciones al inicio y al final del ensayo.

45. Con ensayos semiestáticos en que no se prevea que la concentración de sustancia problema permanezca en el intervalo del ± 20 % de la concentración nominal, habrá que analizar todas las soluciones de ensayo recién preparadas y las mismas soluciones en cada renovación (véase el punto 33). No obstante, en los ensayos en los que la concentración inicial medida de la sustancia problema no esté dentro del intervalo del ± 20 % de la concentración nominal, pero en los que puedan aportarse pruebas suficientes de que las concentraciones iniciales son repetibles y estables (es decir, que están dentro del intervalo del 80-120 % de la concentración inicial), las determinaciones químicas podrían limitarse a las concentraciones de ensayo máxima y mínima. En todos los casos, la determinación de las concentraciones de la sustancia problema antes de la renovación solo tendrá que efectuarse en uno de los recipientes replicados de cada concentración de ensayo (o en los contenidos reunidos de los recipientes replicados).

46. Si se utiliza un ensayo dinámico, será adecuado un régimen de muestreo similar al descrito para los ensayos semiestáticos, incluido el análisis al inicio, a la mitad y al final del ensayo, pero en este caso no será apropiado efectuar mediciones de las soluciones «gastadas». En este tipo de ensayo habrá que comprobar diariamente el caudal de solución madre de sustancia problema o de diluyente y sustancia problema.

47. Si está demostrado que la concentración de la sustancia problema se ha mantenido satisfactoriamente a lo largo de todo el ensayo dentro de un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la medida inicialmente, el análisis de los resultados puede basarse en los valores nominales o medidos inicialmente. Si la desviación respecto a la concentración nominal o medida inicialmente es superior al ± 20 %, el análisis de los resultados deberá basarse en la media geométrica de la concentración durante la exposición o en modelos que describan el descenso de la concentración de la sustancia problema (8).

▼M6

**Ensayo límite**

48. Bajo ciertas circunstancias, por ejemplo cuando un ensayo preliminar indica que la sustancia problema no tiene efectos tóxicos a concentraciones de hasta 100 mg/l, o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo si este valor es más bajo, puede efectuarse un ensayo límite comparando las respuestas de un grupo de control y de un único grupo de tratamiento (100 mg/l o una concentración igual al límite de solubilidad). Se recomienda vivamente que esto se apoye en un análisis de la concentración de exposición. Todas las condiciones de ensayo y criterios de validez antes descritos son aplicables al ensayo límite, con la excepción de que el número de réplicas de tratamiento ha de duplicarse. El crecimiento en el grupo de control y en el de tratamiento pueden analizarse mediante un método estadístico para comparar las medias como, por ejemplo, una prueba t de Student.

DATOS E INFORME

**Tiempo de duplicación**

49. Para determinar el tiempo de duplicación ($T_d$) del número de frondas y el cumplimiento de este criterio de validez por el estudio (punto 12), se aplicará la fórmula siguiente con datos obtenidos de los recipientes de control:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

donde μ es la tasa media de crecimiento específico determinada como se describe en los puntos 54-55.

**Variables de respuesta**

50. El objetivo del ensayo es determinar los efectos de la sustancia problema sobre el crecimiento vegetativo de *Lemna*. El presente método de ensayo describe dos variables de respuesta, ya que las distintas jurisdicciones tienen distintas preferencias y necesidades reglamentarias. Para que los resultados del ensayo sean aceptables en todas las jurisdicciones, los efectos deben evaluarse utilizando las dos variables de respuesta a) y b) que se describen a continuación:

a) *Tasa media de crecimiento específico:* Esta variable de respuesta se calcula a partir del cambio del logaritmo del número de frondas y, además, a partir del cambio del logaritmo de otro parámetro de medición (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco) a lo largo del tiempo (expresado en días) en los controles y en cada grupo de tratamiento. A veces se denomina tasa de crecimiento relativa (12).

b) *Rendimiento*: Esta variable de respuesta se calcula a partir del cambio del número de frondas y, además, a partir del cambio de otro parámetro de medición (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco) en los controles y en cada grupo de tratamiento hasta el final del ensayo.

51. Ha de señalarse que los valores de toxicidad calculados a partir de estas dos variables de respuesta no son comparables y es necesario tener en cuenta esta diferencia cuando se utilicen los resultados del ensayo. Los valores de $EC_x$ basados en la tasa media de crecimiento específico ($E_rC_x$) son normalmente más elevados que los basados en el rendimiento ($E_yC_x$) si se respetan las condiciones del presente método de ensayo, debido al fundamento matemático de los planteamientos respectivos. Esto no debe interpretarse como una diferencia en la sensibilidad de las dos variables de respuesta, sino como una diferencia puramente matemática entre los valores. El concepto de tasa media de crecimiento específico se basa en el modelo general de crecimiento exponencial de la lenteja de agua en cultivos no limitados, estimándose la toxicidad en función de los efectos sobre la tasa de crecimiento, sin depender del nivel absoluto de la tasa de crecimiento específico del control, de la pendiente de la curva concentración-respuesta ni de la duración del ensayo. Por el contrario, los resultados basados en la variable de respuesta «rendimiento» dependen de todas estas otras variables. La $E_yC_x$ depende de la tasa de crecimiento específico de la especie de lenteja de agua utilizada en cada

▼M6

ensayo y de la tasa máxima de crecimiento específico, que puede variar de una especie a otra e incluso de un clon a otro. Esta variable de respuesta no debe utilizarse para comparar la sensibilidad de distintas especies, o incluso distintos clones, de lenteja de agua ante un agente tóxico. Aunque científicamente se prefiere el uso de la tasa media de crecimiento específico para estimar la toxicidad, en el presente método de ensayo se incluye también la estimación a partir del rendimiento para cumplir los requisitos reglamentarios vigentes en ciertas jurisdicciones.

52. Las estimaciones de la toxicidad deben basarse en el número de frondas y en otra variable de medición más (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco), porque ciertas sustancias pueden afectar a otras variables de medición mucho más que al número de frondas. Este efecto no se detectaría si solo se calculara el número de frondas.

53. El número de frondas y las otras variables de medición registradas (es decir, la superficie total de las frondas, el peso seco o el peso fresco) se tabulan junto con las concentraciones de la sustancia problema correspondientes a cada punto de medición. Todo análisis posterior de los datos, por ejemplo para estimar la LOEC, NOEC o $EC_x$, se basará en los valores de las distintas réplicas y no en los promedios calculados de cada grupo de tratamiento.

**Tasa media de crecimiento específico**

54. La tasa media de crecimiento específico correspondiente a un periodo específico se calcula como el incremento logarítmico de las variables de crecimiento, es decir, número de frondas y otra variable de medición (área total de las frondas, peso seco o peso fresco), aplicando la fórmula siguiente a cada réplica de control y de tratamiento:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

donde:

— $\mu_{i-j}$ es la tasa media de crecimiento específico entre el tiempo i y el j

— $N_i$ es la variable de medición del recipiente de ensayo o de control en el tiempo i

— $N_j$ es la variable de medición del recipiente de ensayo o de control en el tiempo j

— t es el tiempo transcurrido entre i y j.

Respecto a cada grupo de tratamiento y de control ha de calcularse un valor medio de la tasa de crecimiento y una estimación de la varianza.

55. Debe calcularse la tasa media de crecimiento específico correspondiente a toda la duración del ensayo (el tiempo i en la fórmula anterior es el principio del ensayo y el tiempo j es el final del mismo). Respecto a cada concentración de ensayo y control ha de calcularse un valor promedio de la tasa media de crecimiento específico con una estimación de la varianza. Por otra parte, debe considerarse la tasa de crecimiento de cada sección para evaluar el efecto de la sustancia problema presente durante el período de exposición (por ejemplo, examinando curvas logarítmicas de crecimiento). Una diferencia importante entre la tasa de crecimiento de cada sección y la tasa media de crecimiento indica una desviación respecto al crecimiento exponencial constante e impone el examen en detalle de las curvas de crecimiento. En este caso, un enfoque conservador sería comparar las tasas de crecimiento específico de cultivos tratados durante el tiempo de inhibición máxima con las correspondientes a los controles durante el mismo tiempo.

56. Después puede calcularse el porcentaje de inhibición en tasa de crecimiento ($I_t$) correspondiente a cada concentración de ensayo (grupo de tratamiento) aplicando la fórmula siguiente:

▼M6

$$\%\ I_r = \frac{(\mu C - \mu T)}{\mu C} \times 100$$

donde:

— % $I_r$: es el porcentaje de inhibición en tasa media de crecimiento específico

— $\mu_C$: es el valor medio de μ en el control

— $\mu_T$: es el valor medio de μ en el grupo de tratamiento

**Rendimiento**

57. Los efectos sobre el rendimiento se determinan a partir de dos variables de medición, el número de frondas y otra variable de medición (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco) observadas en cada recipiente de ensayo al inicio y al final del ensayo. En el caso del peso seco o del peso fresco, la biomasa inicial se determina a partir de una muestra de frondas tomada del mismo lote utilizado para inocular los recipientes de ensayo (véase el punto 20). Respecto a cada concentración de ensayo y control ha de calcularse un valor promedio del rendimiento con una estimación de la varianza. El porcentaje medio de inhibición en rendimiento (% $I_y$) puede calcularse de la manera siguiente con cada réplica de tratamiento:

$$\%\ I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c} \times 100$$

donde:

— % Iy es el porcentaje de reducción en rendimiento

— b es la biomasa final menos la biomasa inicial correspondiente al grupo de control

— $b_T$ es la biomasa final menos la biomasa inicial correspondiente al grupo de tratamiento.

**Trazado de las curvas concentración-respuesta**

58. Se deben trazar las curvas concentración-respuesta que relacionan el porcentaje medio de inhibición de la variable de respuesta ($I_r$ o $I_y$, calculado como se indica en los puntos 56 o 57) con el logaritmo de la concentración de la sustancia problema.

**Estimación de $EC_x$**

59. Las estimaciones de $EC_x$ (por ejemplo, $EC_{50}$) deben basarse tanto en la tasa media de crecimiento específico ($E_rC_x$) como en el rendimiento ($E_yC_x$), cada uno de los cuales debe basarse, a su vez, en el número de frondas y en una variable de medición más (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco). El motivo es que ciertas sustancias problema influyen de forma diferente en el número de frondas y en otras variables de medición. Por tanto, los parámetros buscados de la toxicidad son cuatro valores de $EC_x$ por cada nivel de inhibición x calculado: $E_rC_x$ (número de frondas), $E_rC_x$ (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco), $E_yC_x$ (número de frondas), y $E_yC_x$ (superficie total de las frondas, peso seco o peso fresco).

*Procedimientos estadísticos*

60. El objetivo es obtener una relación cuantitativa concentración-respuesta mediante análisis de regresión. Es posible utilizar una regresión lineal ponderada después de haber efectuado una transformación linealizante de los datos de respuesta como, por ejemplo, en probit o logit o unidades Weibull (13), pero son preferibles los procedimientos de regresión no lineal porque con ellos se tratan mejor las inevitables irregularidades de los datos y las desviaciones respecto a distribuciones regulares. Si la inhibición está próxima al 0 o al 100 %, la transformación puede magnificar tales irregularidades, interfiriendo así con el análisis (13). Debe señalarse que los métodos normales de análisis que utilizan las transformaciones en probit, logit o de Weibull están previstos para aplicarse a datos cuánticos (por ejemplo, mortalidad o

▼M6

supervivencia), y que es necesario modificarlos para aplicarlos a datos de tasas de crecimiento o rendimiento. En las referencias (14), (15) y (16) pueden encontrarse métodos específicos de determinación de los valores de $EC_x$ a partir de datos continuos.

61. Respecto a cada variable de respuesta que haya de analizarse, se utilizará la relación concentración-respuesta para calcular estimaciones puntuales de los valores de $EC_x$. Cuando sea posible, se determinarán los límites de confianza del 95 % de cada estimación. La bondad del ajuste de los datos de respuesta al modelo de regresión se evaluará de forma gráfica o estadística. El análisis de regresión se efectuará utilizando las respuestas de las distintas réplicas y no los promedios de los grupos de tratamiento.

62. Las estimaciones de la $EC_{50}$ y los límites de confianza pueden obtenerse también utilizando la interpolación lineal con remuestreo *(bootstrapping)* (17) si los métodos o modelos de regresión disponibles no son adecuados para los datos.

63. Para la estimación de los valores de LOEC y, por tanto, de NOEC, es necesario comparar los promedios de tratamiento utilizando técnicas de análisis de la varianza (ANOVA). A continuación se ha de comparar el promedio obtenido a cada concentración con el del control, aplicando un método apropiado de comparación múltiple o de prueba de tendencia. Las pruebas de Dunnett o Williams pueden ser útiles (18)(19)(20)(21). Hay que comprobar si se sostiene la hipótesis del ANOVA de homogeneidad de la varianza. Esta comprobación puede realizarse gráficamente o mediante una prueba en regla (22). Son adecuadas las pruebas de Levene o Bartlett. El incumplimiento de la hipótesis de homogeneidad de las varianzas puede corregirse a veces mediante la transformación logarítmica de los datos. Si la heterogeneidad de la varianza es extrema y no puede corregirse mediante transformación, ha de considerarse la posibilidad de efectuar un análisis por métodos como las pruebas de tendencia de Jonkheere de ajuste secuencial. En (16) puede encontrarse más información sobre la determinación de la NOEC.

64. Los recientes avances científicos han llevado a recomendar el abandono del concepto de NOEC para sustituirlo por el de estimaciones puntuales de $EC_x$ basadas en la regresión. Aún no se ha determinado un valor adecuado de x para esta prueba con *Lemna*. Sin embargo, parece que es apropiado el intervalo del 10 al 20 % (según la variable de respuesta elegida) y lo mejor es indicar tanto la $EC_{10}$ como la $EC_{20}$.

**Elaboración de informes**

65. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas, incluido el límite de hidrosolubilidad;

— datos de identificación de la sustancia (por ejemplo, número CAS), incluida la pureza (impurezas).

*Especie de ensayo:*

— nombre científico, clon (si se conoce) y procedencia.

*Condiciones de ensayo:*

— procedimiento de ensayo aplicado (estático, semiestático o dinámico);

— fecha de inicio y duración del ensayo;

— medio de ensayo;

— descripción del diseño experimental: recipientes de ensayo y sus tapas, volúmenes de solución, número de colonias y de frondas por recipiente de ensayo al inicio del ensayo;

— concentraciones de ensayo (nominales y medidas, según proceda) y número de réplicas por concentración;

▼**M6**

— métodos de preparación de las soluciones madre y problema, incluido el eventual uso de disolventes o dispersantes;

— temperatura durante el ensayo;

— fuente, intensidad y homogeneidad de la luz;

— valores de pH de los medios de ensayo y de control;

— concentraciones de la sustancia problema y método de análisis con datos adecuados de evaluación de la calidad (estudios de validación, desviaciones típicas o límites de confianza de los análisis);

— métodos de determinación del número de frondas y otras variables de medición como, por ejemplo, el peso seco, el peso fresco o la superficie de las frondas;

— todas las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

*Resultados:*

— datos en bruto: número de frondas y otras variables de medición en cada recipiente de ensayo y de control en cada observación y momento de análisis;

— medias y desviaciones típicas de cada variable de medición;

— curvas de crecimiento de cada concentración (se recomienda con transformación logarítmica de la variable de medición, véase el punto 55);

— tiempo de duplicación / tasa de crecimiento en el control según el número de frondas;

— variables de respuesta calculadas para cada réplica de tratamiento, con valores medios y coeficiente de variación de las réplicas;

— representación gráfica de la relación concentración-efecto;

— estimaciones de parámetros de la toxicidad correspondientes a variables de respuesta como, p. ej., $EC_{50}$, $EC_{10}$, $EC_{20}$, e intervalos de confianza asociados; en caso de que se calculen la LOEC o la NOEC, se indicarán sus valores y los métodos estadísticos utilizados en su determinación;

— si se ha utilizado el ANOVA, el tamaño del efecto que puede observarse (por ejemplo, la diferencia significativa mínima);

— la eventual estimulación del crecimiento que se haya observado en cualquier recipiente de tratamiento;

— los eventuales signos visibles de fitotoxicidad así como observaciones de las soluciones de ensayo;

— discusión de los resultados del ensayo, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998), pp. 733-742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(2) US EPA — United States Environmental Protection Agency (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp.

(3) AFNOR (Association Française de Normalisation) (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pp.

(4) SSI — Swedish Standards Institute (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 pp. (en sueco).

▼M6

(5) Environment Canada (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 — 120 pp.

(6) Environment Canada (1993). Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(7) I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency.

(8) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, París.

(9) Organización Internacional de Normalización (ISO). ISO DIS 20079. Calidad del agua. Determinación del efecto tóxico de los constituyentes del agua y de las aguas residuales sobre la lenteja de agua (*Lemna minor*). Ensayo de inhibición del crecimiento de la lenteja de agua.

(10) Walbridge, C.T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor* L.). Environmental Research Laboratory — Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3-77 108. September 1977.

(11) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia*, 118/119, 353 — 359.

(12) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 481-483.

(13) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984). Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Env. Sci. Technol*. 19, 713-718.

(14) Nyholm, N., Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992). Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem*. 11, 157-167.

(15) Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11, 1485-1494.

(16) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, París.

(17) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(18) Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096-1121.

(19) Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(20) Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(21) Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 519-531.

(22) Brain, P. and Cousens, R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. *Weed Research*, 29, 93-96.

▼M6

*Apéndice 1*

**Definiciones**

En relación con el presente método de ensayo se aplicarán las siguientes definiciones y abreviaturas:

**Biomasa**: peso seco de materia viva presente en una población. En este ensayo, lo que se mide normalmente son indicadores de la biomasa, como el número de frondas o la superficie de las frondas, por lo que el término de «biomasa» se refiere también a estos indicadores.

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**Clorosis**: amarilleamiento del tejido de la fronda.

**Clon**: organismos o células procedentes de un solo individuo por reproducción asexual. Los individuos del mismo clon son, por tanto, genéticamente idénticos.

**Colonia**: conjunto de frondas madre e hijas (generalmente de 2 a 4) unidas entre sí. A veces se le da el nombre de planta.

**$EC_x$**: concentración de la sustancia problema disuelta en el medio de ensayo que produce una reducción del x % (por ejemplo, del 50 %) en el crecimiento de *Lemna* dentro de un plazo de exposición definido (que debe indicarse explícitamente si es distinto de la duración completa o normal del ensayo). Para expresar de forma inequívoca el valor de EC obtenido a partir de la tasa de crecimiento o del rendimiento, se usan respectivamente los símbolos «$E_rC$» y «$E_yC$», seguidos de la variable de medición que se ha utilizado, por ejemplo $E_rC$ (número de frondas).

**Ensayo dinámico**: ensayo en que las soluciones de ensayo se renuevan continuamente.

**Fronda**: cada una de las estructuras «foliáceas» simples de una planta de lenteja de agua. Es la unidad mínima, es decir, individuo, capaz de reproducirse.

**Deformación**: presencia de frondas con protuberancias o aspecto hinchado.

**Crecimiento**: aumento de la variable de medición, por ejemplo el número de frondas, el peso seco, el peso húmedo o la superficie de las frondas, a lo largo de la duración del ensayo.

**Tasa de crecimiento** (tasa media de crecimiento específico): aumento logarítmico de la biomasa durante el período de exposición.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: concentración estudiada mínima a la que se observa que la sustancia ejerce un efecto estadísticamente significativo de reducción del crecimiento (con $p < 0,05$) cuando se compara con el control, dentro de un tiempo de exposición dado. Sin embargo, es necesario también que todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC ejerzan un efecto nocivo superior o igual al que se observa con dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

**Variables de medición**: variables de cualquier tipo que se miden para expresar el parámetro del ensayo utilizando una o más variables de respuesta diferentes. En este método se consideran variables de medición el número de frondas, la superficie de las frondas, el peso fresco y el peso seco.

**Monocultivo**: cultivo con una sola especie vegetal.

**Necrosis**: tejido de la fronda muerto (es decir, blanco o saturado de agua).

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: concentración estudiada que se encuentra inmediatamente por debajo de la LOEC.

**Fenotipo**: características observables de un organismo determinadas por la interacción de sus genes con su entorno.

**Variables de respuesta**: variables para la estimación de la toxicidad derivadas de cualquier variable de medición que describa la biomasa por distintos métodos de cálculo. A efectos del presente método de ensayo, las tasas de crecimiento y el rendimiento son variables de respuesta derivadas de variables de medición como el número de frondas, la superficie de las frondas, el peso fresco o el peso seco.

▼M6

**Ensayo semiestático (de renovación)**: ensayo en que, a lo largo de su duración, la solución de ensayo se sustituye periódicamente, a intervalos específicos.

**Ensayo estático**: ensayo en que, a lo largo de su duración, no hay renovación de la solución de ensayo.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Parámetro del ensayo**: factor general que, como objetivo del ensayo, es modificado por la sustancia problema respecto al control. En este método el parámetro del ensayo es la inhibición del crecimiento, que se puede expresar mediante diferentes variables de respuesta, basadas en una o más variables de medición.

**Medio de ensayo**: medio de cultivo sintético y completo en que crecen las plantas del ensayo cuando se exponen a la sustancia problema. Esta se disuelve en principio en el medio de ensayo.

**Rendimiento**: valor de una variable de medición para expresar la biomasa al final del período de exposición menos el valor de la variable de medición al inicio del período de exposición.

▼M6

*Apéndice 2*

**Descripción de *Lemna* spp.**

La planta acuática denominada vulgarmente lenteja de agua, *Lemna* spp., pertenece a la familia Lemnaceae, que tiene varias especies de distribución mundial recogidas en cuatro géneros. Se han descrito exhaustivamente sus diferencias de aspecto y taxonomía (1)(2). *Lemna gibba* y *Lemna minor* son especies representativas de las zonas templadas y se utilizan frecuentemente en estudios de toxicidad. Ambas especies tienen un tallo discoidal (fronda) flotante o sumergido y una raíz muy fina que sale del centro de la superficie inferior de cada fronda. Las especies de *Lemna* no suelen echar flores, y las plantas se reproducen vegetativamente haciendo nuevas frondas (3). En comparación con las plantas viejas, las jóvenes tienden a ser más pálidas, tener raíces más cortas y consistir en dos o tres frondas de distintos tamaños. El pequeño tamaño, la sencillez de la estructura, la reproducción asexual y el breve tiempo de generación de *Lemna* son características que convierten a las plantas de este género en idóneas para los ensayos de laboratorio (4)(5).

Debido a la probabilidad de que haya diferencias de sensibilidad entre las especies, solo son válidas las comparaciones de sensibilidad dentro de una misma especie.

Ejemplos de especies de *Lemna* que se utilizan en los ensayos: referencias bibliográficas de las especies

*Lemna aequinoctialis*: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

*Lemna major*: Clark, N.A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. Phys. Chem., 29: 935-941.

*Lemna minor*: United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR) (1996). XP T 90-337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pp.

Swedish Standards Institute (SIS) (1995). Water quality — Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 pp. (en sueco).

*Lemna gibba*: ASTM International (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415-91 (Reapproved 1998), pp. 733-742.

United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., «Public draft». EPA 712-C-96-156. 8 pp.

*Lemna paucicostata*: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959-1969.

*Lemna perpusilla:* Clark, J. R. *et al.* (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla)*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87-96.

*Lemna trisulca*: Huebert, D.B., Shay, J.M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481- 483.

*Lemna valdiviana:* Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102-2111.

Fuentes de las especies de *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto, Toronto, Ontario
Canadá, M5S 3 B2
Tel: +1-416-978-3641
Fax:+1-416-978-5878
Correo electrónico: jacreman@botany.utoronto.ca

▼**M6**

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695-8002
Estados Unidos
Teléfono: 001 (919) 515-7572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91
Estocolmo
Suecia
Tel: +46 8 674 7240
Fax: +46 8 674 7636

Umweltbundesamt (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlín
Alemania
Correo electrónico: lemna@uba.de

BIBLIOGRAFÍA

(1) Hillman, W.S. (1961). The Lemnaceae or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221-287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zúrich, Suiza.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82-991150-0-0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1-14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7-22.

▼**M6**

*Apéndice 3*

**Mantenimiento de cultivos madre**

Los cultivos madre pueden mantenerse a temperaturas bajas (4-10 $^{o}$C) durante tiempos prolongados sin tener que volver a reestablecerlos. El medio de cultivo de *Lemna* puede ser el mismo que se utilice en los ensayos, pero es posible utilizar otros medios ricos en nutrientes para los cultivos madre.

Periódicamente se pasan varias plantas jóvenes, de color verde claro, a nuevos recipientes de cultivo con medio fresco, aplicando una técnica aséptica. En las condiciones de baja temperatura que se indican, pueden hacerse subcultivos a intervalos de hasta tres meses.

Para los cultivos deben utilizarse recipientes estériles de vidrio, químicamente limpios (lavados con ácido); su manipulación se hará asépticamente. En caso de contaminación del cultivo madre, por ejemplo con algas u hongos, se tomarán medidas para eliminar los organismos contaminantes. En relación con las algas y la mayoría de otros organismos contaminantes, esto puede efectuarse mediante esterilización superficial. Se toma una muestra del material vegetal contaminado y se cortan las raíces. A continuación se agita enérgicamente el material en agua limpia, y después se sumerge en solución de hipoclorito sódico al 0,5 % (v/v) durante un tiempo comprendido entre 30 segundos y 5 minutos. Seguidamente se enjuaga el material vegetal con agua estéril y se transfiere, en una serie de lotes, a recipientes de cultivo con medio de cultivo fresco. Aunque este tratamiento puede ocasionar la muerte de muchas frondas, especialmente con tiempos largos de exposición, algunas de las frondas supervivientes estarán normalmente libres de contaminación y podrán utilizarse para reinocular nuevos cultivos.

▼M6

*Apéndice 4*

**Medios**

Se recomiendan medios de cultivo distintos para *L. minor* y *L. gibba*. Para *L. minor* se recomienda una modificación del medio de cultivo normal de Suecia (SIS), y para *L. gibba*, el medio 20X AAP. A continuación se indican las composiciones de ambos medios. Para preparar estos medios deben utilizarse sustancias de grado analítico o reactivo y agua desionizada.

**Medio de cultivo normal de Suecia (SIS) para *Lemna***

— Las soluciones madre I – V se esterilizan en autoclave (120 °C, 15 minutos) o mediante filtración por membrana (de unos 0,2 µm de diámetro de poro).

— Las soluciones madre VI y, en su caso, VII se esterilizan solo mediante filtración por membrana; no deben tratarse en autoclave.

— Las soluciones madre estériles deben conservarse en lugar fresco y oscuro. Las soluciones madre I – V pueden conservarse hasta seis meses, mientras que las soluciones madre VI y, en su caso, VII deben desecharse al cabo de un solo mes.

| Solución madre nº | Sustancia | Concentración en la solución madre (g/l) | Concentración en el medio preparado (gl/l) | Medio preparado | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Elemento | Concentración (mg/l) |
| I | $NaNO_3$ | 8,50 | 85 | Na; N | 32; 14 |
| | $KH_2PO_4$ | 1,34 | 13,4 | K; P | 6,0; 2,4 |
| II | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 15 | 75 | Mg; S | 7,4; 9,8 |
| III | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 7,2 | 36 | Ca; Cl | 9,8; 17,5 |
| IV | $Na_2CO_3$ | 4,0 | 20 | C | 2,3 |
| V | $H_3BO_3$ | 1,0 | 1,00 | B | 0,17 |
| | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0,20 | 0,20 | Mn | 0,056 |
| | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,010 | 0,010 | Mo | 0,0040 |
| | $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,050 | 0,050 | Zn | 0,011 |
| | $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,0050 | 0,0050 | Cu | 0,0013 |
| | $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ | 0,010 | 0,010 | Co | 0,0020 |
| VI | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,17 | 0,84 | Fe | 0,17 |
| | $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 0,28 | 1,4 | — | — |
| VII | MOPS (amortiguador) | 490 | 490 | — | — |

Para preparar un litro de medio SIS, se añaden los volúmenes siguientes a 900 ml de agua desionizada:

▼**M6**

— 10 ml de solución madre I

— 5 ml de solución madre II

— 5 ml de solución madre III

— 5 ml de solución madre IV

— 1 ml de solución madre V

— 5 ml de solución madre VI

— 1 ml de solución madre VII (facultativo)

*Nota:* Con ciertas sustancias problema (véase el punto 11) puede ser necesaria además la solución madre VII (amortiguador de MOPS).

El pH se ajusta a 6,5 ± 0,2 con HCl o NaOH 0,1 o 1 M, y el volumen se lleva a un litro con agua desionizada.

**Medio de cultivo 20X AAP**

Las soluciones madre se preparan con agua destilada o desionizada estéril.

Las soluciones madre estériles deben conservarse en lugar fresco y oscuro. En estas condiciones pueden mantenerse durante al menos 6 u 8 semanas.

Para obtener este medio 20X AAP se necesitan cinco soluciones madre de nutrientes (A1, A2, A3, B y C), preparadas con sustancias de grado reactivo. A unos 850 ml de agua desionizada se añaden 20 ml de cada solución madre de nutrientes para obtener el medio de cultivo. El pH se ajusta a 7,5 ± 0,1 con HCl o NaOH 0,1 o 1 M, y el volumen se lleva a un litro con agua desionizada. Después se pasa el medio a un recipiente estéril a través de un filtro de membrana de unos 0,2 μm.

El medio de cultivo destinado a los ensayos debe prepararse uno o dos días antes de usarlo, a fin de que el pH pueda estabilizarse. Antes de utilizar el medio de cultivo, se comprobará su pH y, en caso necesario, se ajustará añadiendo NaOH o HCl 0,1 o 1 M, como se describe más arriba.

| Solución madre nº | Sustancia | Concentración en la solución madre (g/•l) (*) | Concentración en el medio preparado (mg/•l) (*) | Medio preparado | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Elemento | Concentración (mg/•l) (*) |
| A1 | $NaNO_3$ | 26 | 510 | Na; N | 190; 84 |
| | $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 12 | 240 | Mg | 58,08 |
| | $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 4,4 | 90 | Ca | 24,04 |
| A2 | $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 15 | 290 | S | 38,22 |
| A3 | $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ | 1,4 | 30 | K; P | 9,4; 3,7 |
| B | $H_3BO_3$ | 0,19 | 3,7 | B | 0,65 |
| | $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0,42 | 8,3 | Mn | 2,3 |
| | $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,16 | 3,2 | Fe | 0,66 |

▼**M6**

| Solución madre nº | Sustancia | Concentración en la solución madre (g/•l) (*) | Concentración en el medio preparado (mg/•l) (*) | Medio preparado | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Elemento | Concentración (mg/•l) (*) |
| | $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 0,30 | 6,0 | — | — |
| | $ZnCl_2$ | 3,3 mg/l | 66 µg/l | Zn | 31 µg/l |
| | $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 1,4 mg/l | 29 µg/l | Co | 7,1 µg/l |
| | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 7,3 mg/l | 145 µg/l | Mo | 58 µg/l |
| | $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,012 mg/l | 0,24 µg/l | Cu | 0,080 µg/l |
| C | $NaHCO_3$ | 15 | 300 | Na; C | 220; 43 |

(*) Salvo que se indique otra cosa.

*Nota:* La concentración final teóricamente adecuada de bicarbonato (para evitar un ajuste apreciable del pH) es de 15 mg/l, y no de 300 mg/l. Sin embargo, la experiencia con el medio 20X AAP, incluido el ensayo interlaboratorios relativo al presente método, se basa en 300 mg/l (I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey (1999). The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc — Environment Agency).

**Medio de Steinberg (según ISO 20079)**

Concentraciones y soluciones madre

El medio modificado de Steinberg se utiliza según la norma ISO 20079 con *Lemna minor* solo (ya que en esa norma solo se contempla esta especie), pero los ensayos muestran que pueden obtenerse buenos resultados también con *Lemna gibba*.

Para preparar el medio deben utilizarse sustancias de grado analítico o reactivo y agua desionizada.

El medio nutritivo se prepara a partir de soluciones madre o del medio diez veces más concentrado, que permite una concentración máxima del medio sin precipitación.

*Cuadro 1.*

**Medio de Steinberg con pH estabilizado (modificado según Altenburger)**

| Componente | | Medio nutritivo | |
|---|---|---|---|
| Macroelementos | Peso molecular | mg/l | mmol/l |
| $KNO_3$ | 101,12 | 350,00 | 3,46 |
| $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ | 236,15 | 295,00 | 1,25 |
| $KH_2PO_4$ | 136,09 | 90,00 | 0,66 |
| $K_2HPO_4$ | 174,18 | 12,60 | 0,072 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246,37 | 100,00 | 0,41 |

▼**M6**

| Componente | | Medio nutritivo | |
|---|---|---|---|
| Microelementos | Peso molecular | µg/l | µmol/l |
| $H_3BO_3$ | 61,83 | 120,00 | 1,94 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 287,43 | 180,00 | 0,63 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 241,92 | 44,00 | 0,18 |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 197,84 | 180,00 | 0,91 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 270,21 | 760,00 | 2,81 |
| EDTA disódico dihidratado | 372,24 | 1 500,00 | 4,03 |

*Cuadro 2.*

**Soluciones madre (macroelementos)**

| **1. Macroelementos (concentración 50 veces mayor)** | **g/l** |
|---|---|
| Solución madre 1: | |
| $KNO_3$ | 17,50 |
| $KH_2PO_4$ | 4,5 |
| $K_2HPO_4$ | 0,63 |
| Solución madre 2: | |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 5,00 |
| Solución madre 3: | |
| $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ | 14,75 |

*Cuadro 3.*

**Soluciones madre (microelementos)**

| **2. Microelementos (concentración 1 000 veces mayor)** | **mg/l** |
|---|---|
| Solución madre 4: | |
| $H_3BO_3$ | 120,0 |
| Solución madre 5: | |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 180,0 |
| Solución madre 6: | |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 44,0 |
| Solución madre 7: | |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 180,0 |
| Solución madre 8: | |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 760,00 |
| EDTA disódico dihidratado | 1 500,00 |

— Pueden reunirse las soluciones madre 2 y 3 por un lado y, por otro, de la 4 a la 7 (teniendo en cuenta las concentraciones establecidas).

▼**M6**

— Para poder conservarlas más tiempo, hay que tratar las soluciones madre en autoclave a 121 °C durante 20 min o bien someterlas a esterilización por filtración (0,2 μm). Se recomienda vivamente someter la solución madre 8 a esterilización por filtración (0,2 μm).

Preparación del medio de Steinberg (modificado) a la concentración final

— Se añaden 20 ml de las soluciones madre 1, 2 y 3 (véase el cuadro 2) a unos 900 ml de agua desionizada para evitar la precipitación.

— Se añade 1,0 ml de las soluciones madre 4, 5, 6, 7 y 8 (véase el cuadro 3).

— El pH debe ser de 5,5 ± 0,2 (se ajusta añadiendo un volumen mínimo de solución de NaOH o HCl).

— Se completa con agua hasta 1 000 ml.

— Si las soluciones madres están esterilizadas y se utiliza agua adecuada, no es necesario proceder a otra esterilización. Si se efectúa la esterilización del medio final, la solución madre 8 se añadirá después del pase por autoclave (a 121 °C durante 20 min).

Preparación del medio de Steinberg (modificado) a concentración 10 veces mayor para su conservación intermedia

— Se añaden 20 ml de las soluciones madre 1, 2 y 3 (véase el cuadro 2) a unos 30 ml de agua para evitar la precipitación.

— Se añade 1,0 ml de las soluciones madre 4, 5, 6, 7 y 8 (véase el cuadro 3). Se completa con agua hasta 100 ml.

— Si las soluciones madres están esterilizadas y se utiliza agua adecuada, no es necesario proceder a otra esterilización. Si se efectúa la esterilización del medio final, la solución madre 8 se añadirá después del pase por autoclave (a 121 °C durante 20 min).

— El pH del medio (concentración final) debe ser de 5,5 ± 0,2.

▼M4

## C.27. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTO-AGUA CON SEDIMENTO ENRIQUECIDO

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 218 (2004). Está diseñado para evaluar los efectos de la exposición prolongada de sustancias sobre las larvas del díptero de agua dulce *Chironomus* sp., que viven en los sedimentos. Se basa en los actuales protocolos de ensayo de toxicidad para *Chironomus riparius* y *Chironomus tentans* que se han elaborado en Europa (1) (2) (3) y en América del Norte (4) (5) (6) (7) (8) y se han sometido a ensayos interlaboratorios (1) (6) (9). Pueden utilizarse asimismo otras especies de quironómidos bien documentadas como, por ejemplo, *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. La situación de exposición aplicada en el presente método de ensayo es el enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema. La selección de la situación de exposición adecuada depende de la aplicación que se prevea para el ensayo. La situación de enriquecimiento del sedimento tiene el objetivo de simular niveles acumulados de sustancias que permanecen en el sedimento. Este sistema de exposición implica el enriquecimiento del sedimento de un sistema de ensayo sedimento-agua.

3. Las sustancias que tienen que someterse a ensayo respecto a organismos que viven en los sedimentos suelen permanecer en este compartimento durante largos períodos. Los organismos que viven en los sedimentos pueden estar expuestos a través de varias vías de exposición. La importancia relativa de cada vía de exposición, y el tiempo que tarda cada una de ellas en contribuir a los efectos tóxicos generales, dependen de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia correspondiente. En el caso de las sustancias que se adsorben fuertemente (por ejemplo, con log $K_{ow}$ > 5) o en el de las sustancias que se unen covalentemente con el sedimento, la ingestión de alimentos contaminados puede constituir una vía de exposición significativa. A fin de no subestimar la toxicidad de sustancias muy lipofílicas, puede considerarse la adición de alimentos al sedimento antes de aplicar la sustancia problema. Para tener en cuenta todas las vías potenciales de exposición, el presente método de ensayo insiste en la exposición a largo plazo. La duración del ensayo está en la banda de 20 a 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui,* y de 28 a 65 días en el de *C. tentans.* Si se necesitan datos a un plazo más corto con algún fin específico como, por ejemplo, investigar los efectos de una sustancia inestable, es posible retirar réplicas adicionales tras un plazo de diez días.

4. Los parámetros medidos son el número total de adultos que aparecen y el tiempo transcurrido hasta su aparición. Se recomienda que las mediciones de supervivencia y crecimiento de las larvas no se hagan hasta que hayan pasado diez días si se necesitan datos adicionales a corto plazo, utilizando réplicas adicionales cuando convenga.

5. Se recomienda el uso de sedimentos artificiales, que presentan diversas ventajas sobre los sedimentos naturales:

   — se reduce la variabilidad experimental porque se constituye una "matriz normalizada" reproducible y desaparece la necesidad de conseguir fuentes de sedimentos limpios y no contaminados,

   — pueden iniciarse los ensayos en cualquier momento sin problemas de variabilidad estacional del sedimento en cuestión, y no es necesario aplicar ningún tratamiento previo al sedimento para eliminar la fauna endógena; el uso de un sedimento artificial reduce también el coste asociado con la recogida de campo de cantidades suficientes de sedimentos para los ensayos sistemáticos,

   — el uso de sedimento artificial permite comparar la toxicidad de las sustancias y clasificarlas en consecuencia.

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

▼M4

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se exponen quironómidos de primer estadio larvario a una serie de concentraciones de la sustancia problema en sistemas sedimento-agua. La sustancia problema se introduce en el sedimento y a continuación se toman larvas del primer estadio y se ponen en vasos donde se han estabilizado diferentes concentraciones de sedimento y agua. Al final del ensayo se mide la tasa de aparición de adultos y de desarrollo de quironómidos. También es posible medir la supervivencia y el peso de las larvas a los 10 días en caso necesario, utilizando réplicas adicionales cuando proceda. Estos datos se analizan o bien usando un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en la aparición de adultos o en la supervivencia o el crecimiento de las larvas (por ejemplo, $EC_{15}$, $EC_{50}$, etc.), o bien realizando contrastes estadísticos de hipótesis para determinar la NOEC/LOEC. Esta última posibilidad exige la comparación de valores de efectos con valores que tienen control, utilizando pruebas estadísticas.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

8. Deben conocerse la hidrosolubilidad de la sustancia problema, su presión de vapor, su reparto medido o calculado en el sedimento y su estabilidad en el agua y en el sedimento. Para cuantificar la sustancia problema presente en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, debe disponerse de un método analítico fiable, cuya precisión y límite de detección sean conocidos y se indiquen. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural y la pureza de la sustancia problema. También es útil la información sobre el destino químico de la sustancia problema (por ejemplo, disipación, degradación abiótica y biótica, etc.). En la referencia 12 se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan la realización del ensayo.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Puede realizarse periódicamente un ensayo con sustancias de referencia, para asegurarse de la fiabilidad del protocolo y de las condiciones del ensayo. Las siguientes sustancias son ejemplos de tóxicos de referencia utilizados con éxito en estudios interlaboratorios y de validación: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloruro de cadmio y cloruro de potasio (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDEZ DEL ENSAYO

10. Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la aparición de adultos en los controles no ha de ser inferior al 70 % al final del ensayo (1) (6),

— la aparición de adultos de *C. riparius* y *C. yoshimatsui* en los recipientes de control debe producirse cuando hayan transcurrido entre 12 y 23 días desde su introducción en los recipientes; en el caso de *C. tentans* es necesario un plazo de entre 20 y 65 días,

— al final del ensayo deben medirse en cada recipiente el pH y la concentración de oxígeno disuelto; la concentración de oxígeno debe ser al menos el 60 % del valor de saturación en el aire a la temperatura aplicada, y el pH del agua sobrenadante debe estar en el rango de 6 a 9 en todos los recipientes de ensayo,

— la temperatura del agua no debe variar en más de ± 1,0 °C; la temperatura del agua podría controlarse mediante un espacio isotérmico y, en tal caso, debería confirmarse la temperatura ambiente de ese espacio a intervalos apropiados.

▼M4

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Recipientes de ensayo**

11. El estudio se lleva a cabo en vasos de vidrio de 600 ml de capacidad y 8 cm de diámetro. Pueden utilizarse otros recipientes que garanticen una altura adecuada de sedimento y de agua sobrenadante. La superficie del sedimento debe ser suficiente para que correspondan de 2 a 3 $cm^2$ por larva. La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser de 1:4. Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con el sistema de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte como, por ejemplo, teflón.

**Selección de la especie**

12. La especie que debe usarse preferentemente en el ensayo es *Chironomus riparius.* También es adecuada la especie *Chironomus tentans,* pero resulta más difícil de manejar y requiere un período de ensayo más largo. Asimismo es posible utilizar *Chironomus yoshimatsui.* En el apéndice 2 se da información sobre los métodos de cultivo de *Chironomus riparius.* También se dispone de información sobre las condiciones de cultivo de otras especies, como *Chironomus tentans* (4) y *Chironomus yoshimatsui* (11). Hay que confirmar la identificación de la especie antes de realizar los ensayos, pero no es necesario hacerlo antes de cada ensayo si los organismos proceden de un cultivo del propio laboratorio.

**Sedimento**

13. Es preferible utilizar un sedimento artificial (también denominado formulado, reconstituido o sintético). Sin embargo, si se utiliza sedimento natural, deben determinarse sus características (al menos, el pH y el contenido de carbono, pero es recomendable incluir otros parámetros, como la relación C/N y la granulometría), y debe estar exento de toda contaminación y de otros organismos que pudieran competir con los quironómidos o consumirlos. También se recomienda que el sedimento natural, antes de emplearse en un ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo. Se recomienda utilizar en este ensayo (1) (15) (16) el siguiente sedimento artificial, basado en el suelo artificial empleado en el método de ensayo C.8 (14):

a) 4-5 % de turba (peso seco), de pH lo más próximo posible a la banda 5,5-6,0; es importante utilizar turba en forma de polvo, finamente molida (tamaño de partícula $\leq$ 1 mm) y secada solo al aire;

b) 20 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

c) 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco); debe predominar la arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm;

d) agua desionizada añadida para obtener un contenido de humedad en la mezcla final el rango de 30 a 50 %;

e) carbonato de calcio de calidad químicamente pura ($CaCO_3$) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento a 7,0 ± 0,5; el contenido de carbono orgánico de la mezcla final debe ser del 2 % (± 0,5 %), ajustado mediante el empleo de cantidades adecuadas de turba y arena, según las letras a) y c).

14. Debe conocerse el origen de la turba, del caolín y de la arena. Hay que comprobar que los componentes del sedimento no presentan contaminación química (por ejemplo, con metales pesados, compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, etc.). En el apéndice 3 se describe un ejemplo de preparación del sedimento artificial. Puede aceptarse también la mezcla de componentes secos si se demuestra que, tras la adición de agua sobrenadante, no se produce separación de los componentes del sedimento (por ejemplo, flotación de partículas de turba), y que la turba o el sedimento están suficientemente acondicionados.

▼M4

**Agua**

15. Es adecuada como agua de ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en los apéndices 2 y 4. Puede utilizarse como agua de cultivo y agua de ensayo cualquier agua adecuada, agua natural (superficial o subterránea), agua reconstituida (véase el apéndice 2) o agua del grifo desclorada, siempre que los quironómidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo y ensayo sin mostrar signos de presión. Al inicio del ensayo, el pH del agua de ensayo debe estar entre 6 y 9 y la dureza total no debe superar el valor de 400 mg/l en $CaCO_3$. Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt). Debe usarse el mismo tipo de agua a lo largo de todo el estudio. Las características de calidad del agua recogidas en el apéndice 4 deben medirse al menos dos veces al año o cuando se sospeche que pueden haber cambiado de forma significativa.

**Soluciones madre — sedimentos enriquecidos**

16. Los sedimentos enriquecidos a la concentración elegida se preparan por lo general añadiendo una solución de la sustancia problema directamente al sedimento. La solución madre de la sustancia problema preparada con agua desionizada se mezcla con el sedimento artificial mediante molino de rodillos, mezcladora de piensos o a mano. Si la sustancia problema es poco soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo). Esta solución se mezcla a continuación con 10 g de arena de cuarzo fina para un solo recipiente de ensayo. Se deja que se evapore el disolvente, que tiene que desaparecer totalmente de la arena; después se mezcla la arena con la cantidad adecuada de sedimento para un vaso de ensayo. Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia problema solo pueden utilizarse agentes que se volatilicen rápidamente. No ha de olvidarse que la arena aportada por la mezcla de sustancia problema y arena tiene que tenerse en cuenta a la hora de preparar el sedimento (es decir, el sedimento debe prepararse entonces con menos arena). Debe velarse por que la sustancia problema añadida al sedimento se distribuya de forma total y homogénea por el sedimento. En caso necesario, deben analizarse submuestras para determinar el grado de homogeneidad.

DISEÑO DEL ENSAYO

17. El diseño del ensayo se refiere a la selección del número de concentraciones de ensayo y al intervalo entre las mismas, al número de recipientes por concentración y al número de larvas por recipiente. Se describen los diseños para la estimación puntual de la EC y de la NOEC, así como para realizar un ensayo límite.

**Diseño para análisis de regresión**

18. La concentración con efecto (por ejemplo, $EC_{15}$, $EC_{50}$) y el rango de concentraciones en la que resulta interesante el efecto de la sustancia problema, tienen que estar abarcadas entre las concentraciones incluidas en el ensayo. En general, la exactitud y, sobre todo, la validez con la que pueden hacerse las estimaciones de las concentraciones con efecto ($EC_x$) mejoran cuando la concentración con efecto se encuentra dentro del rango de concentraciones ensayadas. Debe evitarse extrapolar muy por debajo de la menor concentración positiva o por encima de la concentración máxima. Es conveniente efectuar previamente un ensayo para seleccionar el rango de concentraciones que se deba utilizar (véase el punto 27).

▼M4

19. Si ha de estimarse la $EC_x$, deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones y tres réplicas por cada concentración. En cualquier caso, es recomendable utilizar suficientes concentraciones de ensayo para poder hacer una buena estimación del modelo. El factor entre concentraciones no sebe ser mayor que dos (puede permitirse una excepción en los casos en que la pendiente de la curva dosis-respuesta sea poco pronunciada). El número de réplicas de cada tratamiento puede reducirse si aumenta el número de concentraciones de ensayo con diferentes respuestas. El aumento del número de réplicas o la reducción del tamaño del intervalo entre concentraciones de ensayo tiende a estrechar los intervalos de confianza del ensayo. Si se han de estimar la supervivencia y el crecimiento de las larvas a los 10 días, es necesario emplear réplicas adicionales.

**Diseño para estimar una NOEC/LOEC**

20. Si hay que estimar la LOEC y/o la NOEC, se deben emplear cinco concentraciones de ensayo con un mínimo de cuatro réplicas y el factor entre concentraciones no debe exceder de dos. El número de réplicas debe ser suficiente para garantizar una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % ($p = 0,05$). Respecto a la tasa de desarrollo, suele ser adecuado un análisis de la varianza (ANOVA), como el ensayo de Dunnett o el de Williams (17) (18) (19) (20). Para la tasa de aparición, pueden emplearse el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (con la corrección de Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel.

**Ensayo límite**

21. Puede llevarse a cabo un ensayo límite (una sola concentración de ensayo y un control) si no se han observado efectos en el ensayo previamente efectuado para seleccionar el rango de concentraciones. La finalidad del ensayo límite es someter a ensayo una concentración suficientemente elevada como para permitir a los responsables excluir cualquier efecto tóxico de la sustancia problema, y el límite se establece a una concentración que no se espera encontrar en la realidad en ninguna situación. Se recomienda la concentración de 1 000 mg/kg (peso seco). Generalmente hacen falta al menos seis réplicas tanto de las unidades de tratamiento como de las de control. Debe demostrarse una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % ($p = 0,05$). Con una respuesta métrica (tasa de desarrollo y peso), la prueba t es un método estadístico adecuado si los datos cumplen los requisitos de esta prueba (normalidad, varianzas homogéneas). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales o una prueba no paramétrica, tal como la de Wilcoxon-Mann-Whithey. En relación con la tasa de aparición de adultos es adecuada la prueba exacta de Fisher.

PROCEDIMIENTO

**Condiciones de exposición**

*Preparación del sistema sedimento enriquecido-agua*

22. El procedimiento de enriquecimiento descrito en el método de ensayo C.8. Toxicidad para gusanos de tierra es el recomendado para su aplicación a la sustancia problema (14). Los sedimentos enriquecidos se colocan en los recipientes y se añade agua sobrenadante para conseguir una relación de volumen sedimento-agua de 1:4 (véanse los puntos 11 y 15). La altura de la capa de sedimento debe estar entre 1,5 y 3 cm. Para evitar que se separen los ingredientes del sedimento y se resuspendan las partículas finas durante la adición del agua de ensayo a la columna de agua, puede cubrirse el sedimento con un disco de plástico mientras se vierte el agua encima, y retirar el disco inmediatamente a continuación. Puede ser adecuado también utilizar otros dispositivos.

23. Los recipientes de ensayo tienen que estar cubiertos (por ejemplo, con placas de vidrio). Cuando sea necesario, manténgase durante el estudio el volumen de agua inicial añadiendo agua para compensar la evaporación de esta. Para esta operación debe utilizarse agua destilada o desionizada a fin de evitar la formación de sales.

▼M4

*Estabilización*

24. Una vez preparado el sedimento enriquecido con el agua sobrenadante, es conveniente dejar que la sustancia problema se reparta pasando de la fase acuosa al sedimento (3) (4) (6) (13). Esto debe efectuarse de preferencia en las mismas condiciones de temperatura y aireación que el ensayo. El tiempo adecuado para el equilibrado depende de la sustancia y del sedimento, y puede ser del orden de horas o de días, aunque en ciertos casos raros puede llegar a ser de varias semanas (4 o 5 semanas). Como esto daría ocasión para la degradación de muchas sustancias, no se espera hasta alcanzar el equilibrio completo, sino que se recomienda un período de equilibrado de 48 h. Al final de este período de equilibrado, debe medirse la concentración de la sustancia problema en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, al menos a la concentración más elevada y a una inferior (véase el punto 38). Estas determinaciones analíticas de la sustancia problema permiten el cálculo del balance de masas y la expresión de los resultados sobre la base de las concentraciones medidas.

*Adición de los organismos de ensayo*

25. Cuatro o cinco días antes de añadir los organismos de ensayo a los recipientes de ensayo, deben tomarse de los cultivos masas de huevos y ponerlas en recipientes pequeños con medio de cultivo. Puede utilizarse medio viejo del cultivo madre o medio recién preparado. Si se utiliza este último, debe añadírsele una pequeña cantidad de alimento como, por ejemplo, algas verdes o unas gotitas de filtrado de una suspensión finamente molida de alimento para peces en copos (véase el apéndice 2). Solo deben utilizarse masas de huevos recién puestas. Normalmente, las larvas empiezan a salir de los huevos un par de días después de la puesta (de 2 a 3 días en el caso de *Chironomus riparius* a 20 °C y de 1 a 4 días en el de *Chironomus tentans* a 23 °C y en el de *Chironomus yoshimatsui* a 25 °C) y el crecimiento de las larvas tiene lugar en cuatro fases, cada una de entre 4 y 8 días de duración. En el ensayo deben utilizarse larvas de primera fase (2-3 o 1-4 días tras la eclosión). La fase de los animales puede comprobarse midiendo la anchura de la cápsula cefálica (6).

26. Se asignan aleatoriamente veinte larvas de primera fase a cada recipiente de ensayo que contenga el sedimento enriquecido y el agua, utilizando una pipeta de punta roma. Es necesario detener la aireación del agua mientras se ponen las larvas en los recipientes de ensayo y mantener la situación durante otras 24 horas tras la adición de las larvas (véanse los puntos 25 y 32). Según el diseño de ensayo empleado (véanse los puntos 19 y 20), el número de larvas utilizadas por concentración es de al menos 60 para la estimación puntual de la ECx y de 80 para la determinación de la NOEC.

*Concentraciones de ensayo*

27. Puede ser útil efectuar un ensayo preliminar para determinar el rango de concentraciones adecuadas para el ensayo definitivo. Con este fin se utiliza una serie de concentraciones de la sustancia problema, muy diferentes entre sí. A fin de proporcionar la misma densidad superficial por quironómido que se vaya a emplear para el ensayo definitivo, se exponen los quironómidos a cada concentración de la sustancia problema durante un plazo que permita la estimación de las concentraciones de ensayo adecuadas, y no hace falta utilizar réplicas.

28. Las concentraciones de ensayo para el ensayo definitivo se deciden sobre la base del resultado del ensayo de determinación del rango de concentraciones. Deben utilizarse al menos cinco concentraciones y seleccionarse como se describe en los puntos 18 a 20.

▼M4

*Controles*

29. Deben incluirse en el ensayo, con el número adecuado de réplicas, recipientes de control sin sustancia problema pero con sedimento (véanse los puntos 19-20). Si se ha utilizado algún disolvente para aplicar la sustancia problema (véase el punto 16), debe añadirse un control del disolvente en el sedimento.

*Sistema de ensayo*

30. Se emplean sistemas estáticos. Pueden utilizarse en casos excepcionales sistemas semiestáticos o dinámicos con renovación intermitente o continua del agua sobrenadante, como, por ejemplo, si las especificaciones de calidad del agua se hacen inadecuadas para el organismo de ensayo o afectan al equilibrio químico (por ejemplo, cuando los niveles de oxígeno disuelto caen demasiado, la concentración de excrementos se eleva demasiado, o se lixivian minerales del sedimento con modificación del pH y/o de la dureza del agua). Sin embargo, normalmente será suficiente y preferible emplear otros métodos de mejora de la calidad del agua sobrenadante, como la aireación.

*Alimentación*

31. Es necesario alimentar a las larvas, de preferencia una vez al día o, al menos, tres veces por semana. Parece adecuada una ración diaria de comida para peces (suspensión en agua o comida finamente molida como, por ejemplo, Tetra-Min o Tetra-Phyll; véanse detalles en el apéndice 2), de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg para *C. yoshimatsui*) por larva durante los 10 primeros días. Las larvas de más edad pueden necesitar algo más de comida: entre 0,5 y 1 mg por larva al día debería ser suficiente durante el resto del ensayo. La ración alimentaria debe reducirse en todos los tratamientos y controles si se observa crecimiento de hongos o si se aprecia mortalidad en los controles. Si no puede detenerse el desarrollo fúngico, hay que repetir el ensayo. Cuando se someten a ensayo sustancias muy adsorbentes (por ejemplo, con log $K_{ow}$ > 5), o hay sustancias que se unen covalentemente al sedimento, es posible añadir al sedimento artificial, antes del período de estabilización, la cantidad de comida necesaria para garantizar la supervivencia y el crecimiento natural de los organismos. Con este objetivo, debe utilizarse material vegetal en lugar de la comida para peces, por ejemplo, adición de 0,5 % (peso seco) de hojas finamente molidas de ortiga mayor (*Urtica dioica*), morera (*Morus alba*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinaca (*Spinacia oleracea*) u otro material vegetal (*Cerophyl* o alfa-celulosa).

*Condiciones de incubación*

32. Se aporta aireación suave al agua sobrenadante de los recipientes de ensayo, preferentemente a las 24 h de la adición de las larvas, y se continúa a lo largo de todo el ensayo (debe tenerse cuidado para que la concentración de oxígeno disuelto no caiga por debajo del 60 % del valor de saturación en el aire). La aireación se aporta mediante una pipeta Pasteur de vidrio fijada a 2-3 cm por encima del nivel del sedimento, con el ritmo de una o unas pocas burbujas por segundo. Cuando se sometan a ensayo sustancias volátiles, debe considerarse el no airear el sistema sedimento-agua.

33. El ensayo se efectúa a la temperatura constante de 20 °C (± 2 °C). En el caso de *C. tentans* y de *C. yoshimastsui,* las temperaturas recomendadas son de 23 °C y 25 °C (± 2 °C), respectivamente. Se usa un fotoperíodo de 16 h, con una intensidad luminosa de 500 a 1 000 lux.

▼M4

*Duración de la exposición*

34. La exposición comienza con la adición de larvas a los recipientes con sedimento enriquecido y a los de control. La duración máxima del ensayo es de 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui,* y de 65 días en el de *C. tentans.* Si los dípteros aparecen antes, es posible terminar el ensayo tras un mínimo de cinco días desde la aparición del último adulto en los recipientes de control.

**Observaciones**

*Aparición de adultos*

35. Se determinan el tiempo de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras que aparecen completamente. Los machos se identifican fácilmente por sus antenas plumosas.

36. Hay que observar los recipientes de ensayo al menos tres veces por semana para hacer una evaluación visual de los eventuales comportamientos anormales (por ejemplo, dejar el sedimento, nadar de forma inusual) respecto al control. Durante el tiempo en que se prevea que ha de ocurrir la aparición es necesario efectuar un recuento diario de los dípteros aparecidos. Se registran cada día el sexo y el número de los dípteros aparecidos completamente. Tras su identificación, se sacan los dípteros de los recipientes. Las eventuales masas de huevos puestas antes de la terminación del ensayo deben anotarse y después retirarse para evitar la reintroducción de larvas en el sedimento. También debe registrarse el número de pupas visibles de las que no han llegado a aparecer adultos. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre la medición de la aparición de los dípteros.

*Crecimiento y supervivencia*

37. Si han de proporcionarse datos sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas a los 10 días, deben incluirse desde el principio recipientes de ensayo adicionales, de forma que puedan utilizarse después. El sedimento de estos recipientes adicionales se filtra a través de un tamiz de 250 μm para retener las larvas. Los criterios para determinar la muerte son la inmovilidad o la ausencia de reacción ante un estímulo mecánico. Las larvas no recuperadas deben contarse asimismo como muertas (las larvas que hayan muerto al inicio del ensayo pueden haber sido degradadas por los microbios). Se determina el peso seco (libre de cenizas) de las larvas supervivientes por recipiente de ensayo y se calcula el peso seco individual medio por recipiente. Es útil determinar a qué fase pertenecen las larvas supervivientes; para obtener este dato puede utilizarse la medición de la anchura de la cápsula cefálica de cada individuo.

**Mediciones analíticas**

*Concentración de la sustancia problema*

38. Antes de iniciar el ensayo (es decir, la adición de las larvas), se toman muestras de sedimento de al menos un recipiente por tratamiento para la determinación analítica de la concentración de la sustancia problema en el sedimento. Se recomienda que, como mínimo, se analicen muestras del agua sobrenadante, del agua intersticial y del sedimento al inicio (véase el punto 24) y al final del ensayo, a la concentración máxima y a una inferior. Estas determinaciones de la concentración de la sustancia problema informan sobre el comportamiento y el reparto de la sustancia problema en el sistema agua-sedimento.

39. Cuando se hagan mediciones intermedias (por ejemplo, el día n$^{o}$ 7) y si los análisis necesitan grandes muestras que no puedan tomarse de los recipientes de ensayo sin influir en el sistema de ensayo, las determinaciones analíticas deben llevarse a cabo con muestras de recipientes de ensayo adicionales tratados de la misma manera (incluida la presencia de los organismos de ensayo) pero que no se utilizan para las observaciones biológicas.

▼M4

40. El procedimiento recomendado para aislar el agua intersticial es la centrifugación, por ejemplo a 10 000 g y 4 °C durante 30 min. Sin embargo, si se demuestra que la sustancia problema no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial debido a que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño.

*Parámetros fisicoquímicos*

41. Deben medirse de la manera adecuada el pH y la temperatura de los recipientes de ensayo (véase el punto 10). Hay que medir la dureza y el amoníaco en los controles y en un recipiente de ensayo a la concentración máxima, al inicio y al final del ensayo.

DATOS E INFORME

*Tratamiento de los resultados*

42. El objetivo de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia completamente sobre la tasa de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras totalmente aparecidos o, en el caso de los efectos del ensayo de 10 días, sobre la supervivencia y el peso de las larvas. Si no hay ninguna señal de sensibilidades estadísticamente diferentes según los sexos, a efectos de análisis estadísticos pueden agruparse los resultados de machos y de hembras. Las diferencias de sensibilidad entre los sexos pueden evaluarse estadísticamente mediante, por ejemplo, una prueba de tabla de contingencia de $\chi^2$-r × 2. Cuando así se requiera, habrá que determinar la supervivencia de las larvas y su peso seco individual medio por recipiente al cabo de 10 días.

43. Las concentraciones que tienen efecto, expresadas en peso seco y sobre la base de este, se calculan preferentemente a partir de las concentraciones medidas en el sedimento al inicio del ensayo (véase el punto 38).

44. A efectos de computar una estimación puntual para la $EC_{50}$ o cualquier otra $EC_x$, las estadísticas por recipiente pueden utilizarse como réplicas verdaderas. Al calcular el intervalo de confianza para cualquier $EC_x$, debe tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes, o bien hay que mostrar que esta variabilidad es tan pequeña que puede despreciarse. Cuando el modelo sigue el método de los mínimos cuadrados, debe aplicarse una transformación estadística por cada recipiente a fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Sin embargo, los valores de $EC_x$ deben calcularse después de haber vuelto a transformar la respuesta al valor original.

45. Cuando el análisis estadístico se dirige a determinar la NOEC/LOEC mediante contrastes de hipótesis, es necesario tener en cuenta la variabilidad entre recipientes, por ejemplo mediante un análisis de varianza anidado. También puede ser adecuado realizar ensayos más robustos (21) en situaciones en que no se cumplen las hipótesis de los análisis de varianza usuales.

*Tasa de aparición*

46. Las tasas de aparición son datos cuantales y pueden ser analizados por el método de Cochran-Armitage aplicado con ajuste secuencial de residuos cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y estos datos son coherentes con dicha previsión. En caso contrario, puede utilizarse una prueba exacta de Fisher o el método de Mantel-Haenszel con los valores p ajustados según Bonferroni-Holm. Si hay pruebas de que la variabilidad entre réplicas dentro de la misma concentración es mayor de lo que indicaría una distribución binomial (lo que se señala generalmente como variación "extrabinomial"), hay que utilizar un método de Cochran-Armitage o una prueba exacta de Fisher robustos (como se propone en el punto 21).

▼**M4**

Se determina la suma de dípteros aparecidos por recipiente, $n_e$, y se divide por el número de larvas introducidas, $n_a$:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

donde:

$ER$ = tasa de aparición

$n_e$ = número de dípteros aparecidos por recipiente

$n_a$ = número de larvas introducidas por recipiente

47. Otra posibilidad más adecuada para las muestras de gran tamaño, cuando hay variación extrabinomial, consiste en tratar la tasa de aparición como una respuesta continua y emplear procedimientos tales como la prueba de Williams cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y es coherente con estos datos de tasa de aparición. La prueba de Dunnett sería apropiada si no se mantuviera la monotonía. Se define aquí como muestra de gran tamaño la que corresponde a la situación en que tanto el número de dípteros emergidos como el número de no emergidos es superior a cinco, por réplica (recipiente).

48. Para aplicar los métodos de análisis de la varianza, hay que transformar primero los valores de tasa de aparición mediante la transformación arcoseno de la raíz cuadrada o la transformación de Freeman-Tukey para obtener una distribución normal aproximada y uniformizar las varianzas. Cuando se usan las frecuencias absolutas es posible aplicar el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel. La transformación arcoseno de la raíz cuadrada se aplica tomando el arcoseno ($sen^{-1}$) de la raíz cuadrada de la tasa de aparición.

49. Respecto a las tasas de aparición, los valores de $EC_x$ se calculan mediante análisis de regresión [o, por ejemplo, probit (22), logit, Weibull, programas comerciales apropiados, etc.]. Si no sirve el análisis de regresión (por ejemplo, cuando hay menos de dos respuestas parciales), se utilizan otros métodos no paramétricos, tales como la media móvil o la interpolación simple).

*Tasa de desarrollo*

50. El tiempo de desarrollo medio corresponde al intervalo medio de tiempo entre la introducción de las larvas (día 0 del ensayo) y la aparición de la cohorte experimental de dípteros (para el cálculo del tiempo de desarrollo verdadero debe tenerse en cuenta la edad de las larvas en el momento de su introducción). La tasa de desarrollo es la inversa del tiempo de desarrollo (unidades: 1/día) y corresponde a la porción de desarrollo larvario que se produce en un día. Es preferible utilizar la tasa de desarrollo para evaluar estos estudios de toxicidad en los sedimentos, ya que su varianza es menor y es más homogénea y próxima a la distribución normal que el tiempo de desarrollo. Por tanto, pueden usarse procedimientos de ensayos paramétricos más potentes con la tasa de desarrollo que con el tiempo de desarrollo. Considerando a la tasa de desarrollo como respuesta continua, es possible estimar valores de $EC_x$ mediante análisis de regresión [por ejemplo, (23), (24)].

51. En relación con las siguientes pruebas estadísticas, se supone que el número de dípteros observados en el día de inspección x ha aparecido a la media del intervalo de tiempo entre el día x y el día x - 1 (1 = longitud del intervalo de inspección, que es normalmente de 1 día). La tasa de desarrollo media por recipiente ($x$) se calcula con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

donde:

$\bar{x}$: tasa de desarrollo media por recipiente,

i: índice del intervalo de inspección,

m: número máximo de intervalos de inspección,

$f_i$: número de dípteros aparecidos en el intervalo de inspección i,

$n_e$: número total de dípteros aparecidos al final del experimento ($= \sum f_i$),

$x_i$: tasa de desarrollo de los dípteros aparecidos en el intervalo i,

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

donde:

$day_i$: día de inspección (días desde la aplicación),

$l_i$: longitud del intervalo de inspección i (en días, generalmente 1 día).

**Informe del ensayo**

52. El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (hidrosolubilidad, presión de vapor, coeficiente de reparto en el suelo (o en el sedimento, si se conoce), estabilidad en el agua, etc.).

— Datos de identificación química (nombre común, nombre químico, fórmula estructural, número CAS, etc.), incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia problema.

*Especie de ensayo:*

— Animales utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría.

— Información sobre la manipulación de las masas de huevos y de las larvas.

— Edad de los animales de ensayo cuando se introducen en los recipientes de ensayo.

*Condiciones de ensayo:*

— Sedimento utilizado, es decir, si es natural o artificial.

— En el caso del sedimento natural, ubicación y descripción del lugar de muestreo del sedimento, incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación; características: pH, contenido de carbono orgánico, relación C/N y granulometría (cuando sea apropiado).

— Preparación del sedimento artificial: ingredientes y características (contenido de carbono orgánico, pH, humedad, etc., al inicio del ensayo).

— Preparación del agua de ensayo (si se utiliza agua reconstituida) y características (concentración de oxígeno, pH, conductividad, dureza, etc., al inicio del ensayo).

— Altura del sedimento y del agua sobrenadante.

— Volumen del agua sobrenadante y del agua intersticial, peso del sedimento húmedo con y sin agua intersticial.

▼M4

— Recipientes de ensayo (material y tamaño).

— Método para enriquecer el sedimento: concentraciones de ensayo utilizadas, número de réplicas y empleo eventual de disolvente.

— Fase de estabilización (equilibrado) del sistema sedimento enriquecido – agua: duración y condiciones.

— Condiciones de incubación: temperatura, intensidad y ciclo de luz, aireación (frecuencia e intensidad).

— Información detallada sobre la alimentación de los animales, incluidos el tipo de alimento, la preparación, la cantidad y el régimen alimentario.

*Resultados:*

— Concentraciones de ensayo nominales, concentraciones de ensayo medidas y resultados de todos los análisis efectuados para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo.

— Calidad del agua de los recipientes de ensayo, es decir, pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza y amoníaco.

— Sustitución del agua de ensayo evaporada, en su caso.

— Número de dípteros machos y hembras aparecidos por recipiente y por día.

— Número de larvas que no han aparecido como dípteros por recipiente.

— Peso seco individual medio de las larvas por recipiente, y por fase, en caso apropiado.

— Porcentaje de apariciones por réplica y concentración de ensayo (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

— Tasa de desarrollo media de los dípteros aparecidos completamente por réplica y tasa de tratamiento (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

— Estimación de los parámetros de toxicidad como, por ejemplo, $EC_x$ (con intervalos de confianza asociados), NOEC y/o LOEC, y métodos estadísticos empleados para su determinación.

— Discusión de los resultados del ensayo, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (Hyalella azteca) and midge larvae (Chironomus riparius). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in Chironomus yoshimatsui. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Método de ensayo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

(15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

A efectos del presente método de ensayo, aplicarán las siguientes definiciones:

**Sedimento artificial** (o sedimento reconstituido, formulado o sintético): una mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

**Agua sobrenadante:** el agua situada sobre el sedimento en el recipiente de ensayo.

**Agua intersticial:** el agua que ocupa el espacio entre el sedimento y las partículas del suelo.

**Sedimento enriquecido:** el sedimento al que se ha añadido sustancia problema.

**Sustancia problema:** toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

▼M4

*Apéndice 2*

**Recomendaciones para el cultivo de *Chironomus riparius***

1. Las larvas de *Chironomus* pueden criarse en cristalizadores o en recipientes más grandes. Sobre el fondo del recipiente se extiende arena de cuarzo fina, en una capa delgada de unos 5 a 10 mm de espesor. Se ha comprobado que la tierra de diatomeas (por ejemplo, Merck, Art 8117) también constituye un sustrato adecuado (es suficiente una capa más fina, de muy pocos milímetros). A continuación se añade agua adecuada hasta una altura de varios centímetros. Los niveles deben mantenerse rellenando con agua en la medida necesaria para compensar las pérdidas por evaporación y evitar la desecación. En caso necesario, es posible sustituir el agua. Debe aportarse una aireación suave. Los recipientes de cría de las larvas deben mantenerse en una jaula adecuada para evitar que se escapen los adultos que aparezcan. La jaula debe ser lo suficientemente grande como para permitir el enjambrado de los adultos aparecidos, ya que en caso contrario puede que no haya copulación (las dimensiones mínimas son de unos 30 × 30 × 30 cm).

2. Las jaulas deben mantenerse a temperatura ambiente o en una zona de ambiente constante a 20 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz (de intensidad alrededor de 1 000 lux) y 8 horas de oscuridad. Se ha comunicado que una humedad relativa del aire de menos del 60 % puede impedir la reproducción.

**Agua de dilución**

3. Puede emplearse cualquier agua natural o sintética que sea adecuada. Se suelen utilizar agua de pozo, agua del grifo desclorada y medios artificiales (como, por ejemplo, medio M4 o M7 de Elendt, véase más abajo). Es necesario airear el agua antes de emplearla. En caso necesario, el agua de cultivo puede renovarse sacando cuidadosamente, por vertido o con sifón, el agua usada de los recipientes de cultivo, sin destruir los tubos de las larvas.

**Alimentación de las larvas**

4. Las larvas de *Chironomus* deben alimentarse con comida para peces en copos (Tetra Min®, Tetra Phyll® u otra marca similar de comida comercial para peces), al ritmo de aproximadamente 250 mg por recipiente al día. Puede administrarse como polvo molido seco o como suspensión en agua: se añade 1,0 g de comida en copos a 20 ml de agua de dilución y se mezcla para obtener un resultado homogéneo. Esta preparación puede administrarse al ritmo de unos 5 ml por recipiente al día y ha de agitarse antes de usarse. Las larvas más viejas pueden recibir más cantidad.

5. La alimentación se ajusta según la calidad del agua. Si el medio de cultivo se pone turbio, hay que reducir la alimentación. Es necesario supervisar cuidadosamente la adición de comida. Si la comida es demasiado escasa, se provocará la emigración de las larvas hacia la columna de agua, mientras que si es excesiva aumentará la actividad microbiana y se reducirá la concentración de oxígeno. Ambas situaciones pueden producir un descenso de la tasa de crecimiento.

6. Es posible añadir también algunas células de algas verdes (como, por ejemplo, *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) cuando se establecen recipientes de cultivo nuevos.

**Alimentación de los adultos aparecidos**

7. Algunos experimentadores han sugerido que un disco de algodón empapado en una solución saturada de sacarosa puede servir de alimento para los adultos aparecidos.

▼M4

**Aparición de adultos**

8. A 20 ± 2 °C, los adultos empiezan a aparecer en los recipientes de cría de larvas a los 13-15 días aproximadamente. Los machos se distinguen fácilmente porque tienen antenas plumosas.

**Masas de huevos**

9. Una vez haya adultos en la jaula de cría, deben supervisarse todos los recipientes de cría de larvas tres veces por semana para observar la puesta de masas gelatinosas de huevos. Cuando se encuentren, las masas de huevos deben retirarse cuidadosamente y transferirse a una pequeña placa que contenga una muestra del agua de cría. Las masas de huevos se emplean para iniciar un nuevo recipiente de cultivo (por ejemplo, 2-4 masas de huevos por recipiente) o para los ensayos de toxicidad.

10. Las larvas en primer estadio deben salir de los huevos al cabo de 2 – 3 días.

**Establecimiento de nuevos recipientes de cultivo**

11. Cuando se hayan establecido los cultivos, debe ser posible establecer un nuevo recipiente de cultivo de larvas cada semana o con menos frecuencia, según los requisitos de cultivo, eliminando los recipientes más viejos una vez han aparecido los dípteros adultos. Con este sistema, se obtendrá un suministro regular de adultos, con una gestión mínima.

**Preparación de las soluciones de ensayo M4 y M7**

12. Elendt (1990) describió el medio M4. El M7 se prepara como el medio M4, salvo en lo relativo a las sustancias indicadas en el cuadro 1, cuyas concentraciones son cuatro veces más bajas en el medio M7 que en el M4. Se está preparando una publicación sobre el medio M7 (Elendt, comunicación personal). La solución de ensayo no debe prepararse siguiendo a Elendt y Bias (1990), ya que no son adecuadas las concentraciones de $NaSiO_3$ 5 $H_2O$, $NaNO_3$, $KH_2PO_4$ y $K_2HPO_4$ dadas para la preparación de las soluciones madre.

**Preparación del medio M7**

13. Las soluciones madre (I) se preparan por separado cada una y a partir de ellas se prepara una solución madre combinada (II) (véase el cuadro 1). Se toman 50 ml de la solución madre combinada (II) junto con las cantidades de solución madre de cada macronutriente que se dan en el cuadro 2 y se llevan a 1 litro con agua desionizada para preparar el medio M7. Se prepara una solución madre de vitaminas añadiendo tres vitaminas a agua desionizada como se indica en el cuadro 3, y se añaden al medio M7 final 0,1 ml de la solución madre de vitaminas combinadas, poco antes de su empleo (la solución madre de vitaminas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas). El medio se airea y se estabiliza.

*BIBLIOGRAFÍA:*

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius:* Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼**M4**

*Cuadro 1*

**Soluciones madre de oligoelementos para los medios M4 y M7**

| Soluciones madre (I) | Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada | Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada | | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ (1) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl (1) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| $Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Estas sustancias difieren en M4 y M7, como se indica más arriba.
(2) Estas soluciones se preparan por separado y después se juntan y se pasan por el autoclave inmediatamente.

*Cuadro 2*

**Soluciones madre de macronutrientes para los medios M4 y M7**

| | Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg) | Cantidad de soluciones madre de macronutrientes añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l) | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| $NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$ | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼**M4**

*Cuadro 3*

**Solución madre de vitaminas para los medios M4 y M7. Las tres soluciones de vitaminas se combinan para formar una única solución madre de vitaminas**

| | Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg) | Cantidad de solución madre de vitaminas añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l) | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Clorhidrato de tiamina | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cianocobalamina (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotina | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

*BIBLIOGRAFÍA:*

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna. Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

*Apéndice 3*

PREPARACIÓN DEL SEDIMENTO ARTIFICIAL

**Composición del sedimento**

La composición del sedimento artificial debe ser la siguiente:

| Componente | Características | % de sedimento en peso seco |
|---|---|---|
| Turba | Turba esfágnea, de pH lo más próximo posible a 5,5-6,0, sin restos vegetales visibles, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada al aire | 4 - 5 |
| Arena de cuarzo | Granulometría: > 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50-200 μm | 75 - 76 |
| Caolín | Contenido en caolinita ≥ 30 % | 20 |
| Carbono orgánico | Ajustado mediante adición de turba y arena | 2 (± 0,5) |
| Carbonato de calcio | $CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro | 0,05 - 0,1 |
| Agua | Conductividad ≤ 10 μS/cm | 30 - 50 |

**Preparación**

La turba se seca al aire y se tritura hasta convertirse en un polvo fino. Se prepara en agua desionizada una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba, utilizando un dispositivo de homogeneización de prestaciones elevadas. El pH de esta suspensión se ajusta a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. La suspensión se deja durante al menos dos días con agitación suave a 20 ± 2 °C, para estabilizar el pH e implantar un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH, que debe quedar a 6,0 ± 0,5. A continuación se mezcla la suspensión de turba con los demás componentes (arena y caolín) y con agua desionizada para obtener un sedimento homogéneo con un contenido de agua del 30-50 % del peso seco del sedimento. Se vuelve a medir el pH de la mezcla final y se ajusta a 6,5-7,5 con $CaCO_3$ en caso necesario. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido en carbono orgánico. Se recomienda a continuación que el sedimento artificial, antes de emplearse en el ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo.

**Almacenamiento**

Los componentes secos utilizados para preparar el sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente. El sedimento (húmedo) ya preparado no debe almacenarse antes de su empleo en el ensayo. Debe utilizarse inmediatamente tras el tiempo de acondicionamiento de 7 días con que termina su preparación.

*BIBLIOGRAFÍA:*

Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

*Apéndice 4*

**Características químicas aceptables del agua de dilución**

| Sustancia | Concentraciones |
|---|---|
| Materia en partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Dureza expresada en $CaCO_3$ | < 400 mg/l (*) |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

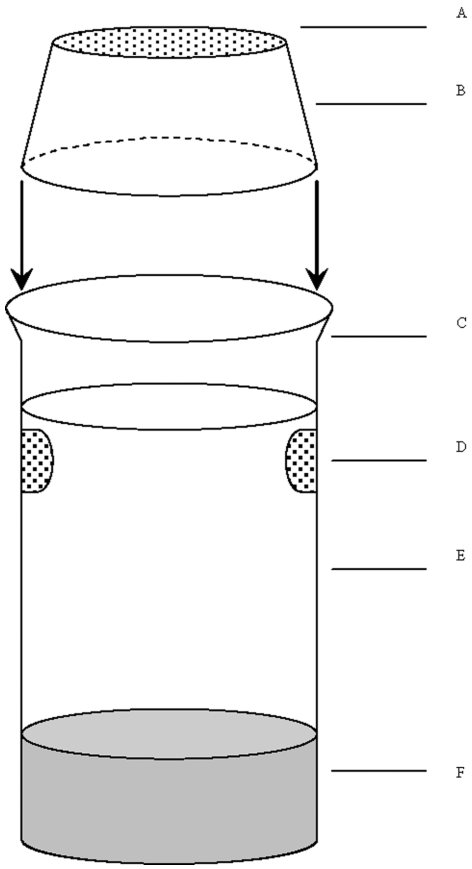
(*) Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt).

▼**M4**

*Apéndice 5*

**Orientaciones para el seguimiento de la aparición de las larvas de quironómidos**

Se ponen trampas de aparición en los vasos del ensayo. Estas trampas tienen que mantenerse desde el día 20 hasta el final del ensayo. A continuación figura el esquema de un ejemplo de trampa:




A: tamiz de nailon

B: tazas de plástico invertidas

C: vaso de exposición sin pico

D: accesos con tamiz para intercambio de agua

E: agua

F: sedimento

▼M4

## C.28. ENSAYO DE TOXICIDAD PARA QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTOS-AGUA CON AGUA ENRIQUECIDA

INTRODUCCIÓN

1. El presente método es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 219 (2004). El presente método de ensayo está diseñado para evaluar los efectos de la exposición prolongada de sustancias sobre las larvas del díptero de agua dulce *Chironomus* sp., que viven en los sedimentos. Se basa principalmente en las directrices del BBA, que utiliza un sistema de ensayo sedimento-agua con suelo artificial, y una situación de exposición en la columna de agua (1). También tiene en cuenta los actuales protocolos de ensayo de toxicidad para *Chironomus riparius* y *Chironomus tentans* que se han elaborado en Europa y en América del Norte (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) y se han sometido a ensayos interlaboratorios (1) (6) (9). Pueden utilizarse asimismo otras especies de quironómidos bien documentadas como, por ejemplo, *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. La situación de exposición empleada en el presente método de ensayo es el enriquecimiento del agua. La selección de la situación de exposición adecuada depende de la aplicación que se prevea para el ensayo. La situación de exposición en agua, que implica el enriquecimiento de la columna de agua, pretende simular un caso de aerosol errático de un plaguicida y comprende el pico inicial de concentraciones en el agua intersticial. También es útil para otros tipos de exposición (incluidos los vertidos de sustancias), salvo los procesos de acumulación que duren más que el período de ensayo.

3. Las sustancias que tienen que someterse a ensayo respecto a organismos que viven en los sedimentos suelen permanecer en este compartimento durante largos plazos. Los organismos que viven en los sedimentos pueden estar expuestos a través de varias vías de exposición. La importancia relativa de cada vía de exposición, y el tiempo que tarda cada una de ellas en contribuir a los efectos tóxicos generales, dependen de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia correspondiente. En el caso de las sustancias que se adsorben fuertemente (por ejemplo, con log $K_{ow}$ > 5) o en el de las sustancias que se unen covalentemente con el sedimento, la ingestión de alimentos contaminados puede constituir una vía de exposición significativa. A fin de no subestimar la toxicidad de sustancias muy lipofílicas, puede considerarse la adición de alimentos al sedimento antes de aplicar la sustancia problema. Para tener en cuenta todas las vías potenciales de exposición, el presente método de ensayo insiste en la exposición a largo plazo. La duración del ensayo está en la banda de 20 a 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui,* y de 28 a 65 días en el de *C. tentans.* Si se necesitan datos a un plazo más corto con algún fin específico como, por ejemplo, para investigar los efectos de sustancias inestables, es posible retirar réplicas paralelas adicionales tras un plazo de diez días.

4. Los parámetros medidos son el número total de adultos que aparecen y el tiempo transcurrido hasta la aparición. Se recomienda que las mediciones de supervivencia y crecimiento de las larvas no se hagan hasta que hayan pasado diez días si se necesitan datos adicionales a corto plazo, utilizando réplicas adicionales cuando convenga.

5. Se recomienda el uso de sedimentos artificiales, que presentan diversas ventajas sobre los sedimentos naturales:

— se reduce la variabilidad experimental porque se constituye una "matriz normalizada" reproducible y desaparece la necesidad de conseguir fuentes de sedimentos limpios y no contaminados,

— pueden iniciarse los ensayos en cualquier momento sin problemas de variabilidad estacional del sedimento en cuestión, y no es necesario aplicar ningún tratamiento previo al sedimento para eliminar la fauna endógena; el uso de un sedimento artificial reduce también el coste asociado con la recogida de campo de cantidades suficientes de sedimentos para los ensayos sistemáticos,

▼M4

— el uso de sedimento artificial permite comparar la toxicidad de las sustancias y clasificarlas en consecuencia: son comparables los datos de toxicidad obtenidos de ensayos realizados con sedimentos naturales y artificiales en relación con diversas sustancias (2).

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se exponen quironómidos de la primera fase del estado larvario a una serie de concentraciones de la sustancia problema en sistemas sedimento-agua. El ensayo se inicia poniendo larvas de primer estadio en vasos de ensayo que contienen el sistema sedimento-agua y a continuación se añade al agua la sustancia problema. Al final del ensayo se mide la tasa de aparición y de desarrollo de quironómidos. También es posible medir la supervivencia y el peso de las larvas a los 10 días en caso necesario, utilizando réplicas adicionales cuando proceda. Estos datos se analizan o bien usando un modelo de regresión para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en la aparición o en la supervivencia o el crecimiento de las larvas (por ejemplo, $EC_{15}$, $EC_{50}$, etc.), o bien realizando contrastes estadísticos de hipótesis para determinar la NOEC/LOEC. Esta última posibilidad exige la comparación de valores que tienen efectos con valores de control, utilizando pruebas estadísticas.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

8. Deben conocerse la hidrosolubilidad de la sustancia problema, su presión de vapor, su reparto medido o calculado en el sedimento y su estabilidad en el agua y en el sedimento. Para cuantificar la sustancia problema presente en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, debe disponerse de un método analítico fiable, cuya precisión y límite de detección sean conocidos y se indiquen. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural y la pureza de la sustancia problema. También es útil la información sobre el destino químico de la sustancia problema (por ejemplo, disipación, degradación abiótica y biótica, etc.). En la referencia 12 se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan la realización del ensayo.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Puede realizarse periódicamente un ensayo con sustancias de referencia, para asegurarse de la fiabilidad del protocolo y de las condiciones del ensayo. Las siguientes sustancias son ejemplos de tóxicos de referencia utilizados con éxito en estudios interlaboratorios y de validación: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloruro de cadmio y cloruro de potasio (1) (2) (5) (6) (13).

VALIDEZ DEL ENSAYO

10. Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la aparición de adultos en los controles no ha de ser inferior al 70 % al final del ensayo (1) (6),

— la aparición de adultos de *C. riparius* y *C. yoshimatsui* en los recipientes de control debe producirse cuando hayan transcurrido entre 12 y 23 días desde su introducción en los recipientes; en el caso de *C. tentans* es necesario un plazo de entre 20 y 65 días,

— al final del ensayo deben medirse en cada recipiente el pH y la concentración de oxígeno disuelto; la concentración de oxígeno debe ser al menos el 60 % del valor de saturación en el aire a la temperatura aplicada, y el pH del agua sobrenadante debe estar en el rango de 6 a 9 en todos los recipientes de ensayo,

▼M4

— la temperatura del agua no debe variar en más de ± 1,0 °C; la temperatura del agua podría controlarse mediante un espacio isotérmico y, en tal caso, debería confirmarse la temperatura ambiente de ese espacio a intervalos apropiados.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Recipientes de ensayo**

11. El estudio se lleva a cabo en vasos de vidrio de 600 ml de capacidad y 8 cm de diámetro. Pueden utilizarse otros recipientes que garanticen una altura adecuada de sedimento y de agua sobrenadante. La superficie del sedimento debe ser suficiente para que correspondan de 2 a 3 $cm^2$ por larva. La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser de 1:4. Los recipientes de ensayo y demás instrumentos que hayan de entrar en contacto con el sistema de ensayo serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte como, por ejemplo, teflón.

**Selección de las especies**

12. La especie que debe usarse preferentemente en el ensayo es *Chironomus riparius.* También es adecuada la especie *Chironomus tentans,* pero resulta más difícil de manejar y requiere un período de ensayo más largo. Asimismo es posible utilizar *Chironomus yohimatsui.* En el apéndice 2 se da información sobre los métodos de cultivo de *Chironomus riparius*. También se dispone de información sobre las condiciones de cultivo de otras especies, como *Chironomus tentans* (4) y *Chironomus yoshimatsui* (11). Hay que confirmar la identificación de la especie antes de realizar los ensayos, pero no es necesario hacerlo antes de cada ensayo si los organismos proceden de un cultivo del propio laboratorio.

**Sedimento**

13. Es preferible utilizar un sedimento artificial (también denominado formulado, reconstituido o sintético). Sin embargo, si se utiliza sedimento natural, deben determinarse sus características (al menos, el pH y el contenido de carbono, pero es recomendable incluir otros parámetros, como la relación C/N y la granulometría), y debe estar exento de toda contaminación y de otros organismos que pudieran competir con los quironómidos o consumirlos. También se recomienda que el sedimento natural, antes de emplearse en un ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo. Se recomienda utilizar en este ensayo (1) (15) (16) el siguiente sedimento artificial, basado en el suelo artificial empleado en el método de ensayo C.8 (14):

a) 4-5 % de turba (peso seco): de pH lo más próximo posible a la banda 5,5-6,0; es importante utilizar turba en forma de polvo, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada solo al aire;

b) 20 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

c) 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco); debe predominar la arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm;

d) agua desionizada para obtener un contenido de humedad en la mezcla final en el rango de 30 a 50 %;

e) carbonato de calcio de calidad químicamente pura ($CaCO_3$) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento a 7,0 ± 0,5;

f) el contenido de carbono orgánico de la mezcla final debe ser del 2 % (± 0,5 %), ajustado mediante el empleo de cantidades adecuadas de turba y arena, según las letras a) y c).

▼M4

14. Debe conocerse el origen de la turba, del caolín y de la arena. Hay que comprobar que los componentes del sedimento no presentan contaminación química (por ejemplo, con metales pesados, compuestos organoclorados, compuestos organofosforados, etc.). En el apéndice 3 se describe un ejemplo de preparación del sedimento artificial. Puede aceptarse también la mezcla de componentes secos si se demuestra que, tras la adición de agua sobrenadante, no se produce separación de los componentes del sedimento (por ejemplo, flotación de partículas de turba), y que la turba o el sedimento están suficientemente acondicionados.

**Agua**

15. Es adecuada como agua para el ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en los apéndices 2 y 4. Puede utilizarse como agua de cultivo y agua de ensayo cualquier agua adecuada, agua natural (superficial o subterránea), agua reconstituida (véase el apéndice 2) o agua del grifo desclorada, siempre que los quironómidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo y ensayo sin mostrar signos de presión. Al inicio del ensayo, el pH del agua de ensayo debe estar entre 6 y 9 y la dureza total no debe superar el valor de 400 mg/l en $CaCO_3$. Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt). Debe usarse el mismo tipo de agua a lo largo de todo el estudio. Las características de calidad del agua recogidas en el apéndice 4 deben medirse al menos dos veces al año o cuando se sospeche que pueden haber cambiado de forma significativa.

**Soluciones madre — agua enriquecida**

16. Las concentraciones de ensayo se calculan a partir de las concentraciones en la columna de agua, es decir, en el agua sobrenadante, que recubre al sedimento. Las soluciones de ensayo de las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. A ser posible, estas soluciones madre deben prepararse disolviendo la sustancia en medio de ensayo. En algunos casos puede ser necesario utilizar disolventes o dispersantes para obtener una solución madre a la concentración deseada. Como ejemplos de disolventes adecuados pueden darse los siguientes: etanol, metanol, éter monometílico de etilenglicol, éter dimetílico de etilenglicol, dimetilformamida y trietilenglicol. Los dispersantes utilizables son Cremaphor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % y HCO-40. La concentración del agente solubilizante en el medio de ensayo final debe ser mínima (es decir, $\leq$ 0,1 ml/l) y la misma en todos los tratamientos. Si se emplea un agente solubilizante, no debe actuar de forma significativa sobre la supervivencia ni producir efectos nocivos visibles sobre las larvas de quironómidos, lo cual ha de demostrarse en un lote de control que solo lleve disolvente. No obstante, debe hacerse todo lo posible por evitar el uso de dichas sustancias.

DISEÑO DEL ENSAYO

17. El diseño del ensayo se refiere a la selección del número de concentraciones de ensayo y al intervalo entre las mismas, al número de recipientes por concentración y al número de larvas por recipiente. Se describen los diseños para la estimación puntual de la EC y de la NOEC, así como para realizar un ensayo límite. Es preferible el análisis de regresión antes que el planteamiento de contrastes de hipótesis.

*Diseño para análisis de regresión*

18. La concentración con efecto (por ejemplo, $EC_{15}$, $EC_{50}$) y el rango de concentraciones en la que resulta interesante el efecto de la sustancia problema, tienen que estar abarcadas entre las concentraciones incluidas en el ensayo. En general, la exactitud y, sobre todo, la validez con la que pueden hacerse las estimaciones de las concentraciones con efecto ($EC_x$) mejoran cuando la

▼M4

concentración con efecto se encuentra dentro del rango de concentraciones ensayadas. Debe evitarse extrapolar muy por debajo de la menor concentración positiva o por encima de la concentración máxima. Es conveniente efectuar previamente un ensayo para seleccionar el rango de concentraciones que se deba utilizar (véase el punto 27).

19. Si ha de estimarse la $EC_x$, deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones y tres réplicas por cada concentración. En cualquier caso, es recomendable utilizar suficientes concentraciones de ensayo para poder hacer una buena estimación del modelo. El factor entre concentraciones no sebe ser mayor que dos (puede permitirse una excepción en los casos en que la pendiente de la curva dosis-respuesta sea poco pronunciada). El número de réplicas de cada tratamiento puede reducirse si aumenta el número de concentraciones de ensayo con diferentes respuestas. El aumento del número de réplicas o la reducción del tamaño del intervalo entre concentraciones de ensayo tiende a estrechar los intervalos de confianza del ensayo. Si se han de estimar la supervivencia y el crecimiento de las larvas a los 10 días, es necesario emplear réplicas adicionales.

*Diseño para estimar una NOEC/LOEC*

20. Si hay que estimar la LOEC y/o la NOEC, se deben emplear cinco concentraciones de ensayo con un mínimo de cuatro réplicas y el factor entre concentraciones no debe exceder de dos. El número de réplicas debe ser suficiente para garantizar una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % ($p = 0,05$). Respecto a la tasa de desarrollo, suele ser adecuado un análisis de la varianza (ANOVA), como el ensayo de Dunnett o el de Williams (17) (18) (19) (20). Para la tasa de aparición, pueden emplearse el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (con la corrección de Bonferroni), o el método de Mantel-Haenszel.

*Ensayo límite*

21. Puede llevarse a cabo un ensayo límite (una sola concentración de ensayo y un control) si no se han observado efectos en el ensayo previamente efectuado para seleccionar la banda de concentraciones. El objetivo del ensayo límite es indicar que el valor tóxico de la sustancia problema es superior a la concentración límite estudiada. No es posible formular en el presente método de ensayo ninguna sugerencia de concentración recomendada; queda al criterio de las autoridades reguladoras. Generalmente hacen falta al menos seis réplicas tanto de las unidades de tratamiento como de las de control. Debe demostrarse una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % ($p = 0,05$). Con una respuesta métrica (tasa de desarrollo y peso), la prueba t es un método estadístico adecuado si los datos cumplen los requisitos de esta prueba (normalidad, varianzas homogéneas). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales o una prueba no paramétrica, tal como la de Wilcoxon-Mann-Whithey. En relación con la tasa de aparición de adultos es adecuada la prueba exacta de Fisher.

PROCEDIMIENTO

**Condiciones de exposición**

*Preparación del sistema agua enriquecida-sedimento*

22. Se añaden a los recipientes de ensayo cantidades adecuadas del sedimento artificial (véanse los puntos 13-14 y el apéndice 3) para formar una capa de al menos 1,5 cm. Se añade agua hasta una altura de 6 cm (véase el punto 15). La proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua no debe ser mayor que 1:4, y la capa de sedimento no debe tener una altura mayor que 3 cm. El sistema sedimento-agua debe dejarse con aireación suave durante siete días antes de que se añadan los organismos de ensayo (véanse el punto 14 y el apéndice 3). Para evitar que se separen los ingredientes del sedimento y se resuspendan las partículas finas durante la adición del agua de ensayo a la columna de agua, puede cubrirse el sedimento con un disco de plástico mientras se vierte el agua encima, y retirar el disco inmediatamente a continuación. Puede ser adecuado también utilizar otros dispositivos.

▼M4

23. Los recipientes de ensayo tienen que estar cubiertos (por ejemplo, con placas de vidrio). Cuando sea necesario, manténgase durante el estudio el volumen de agua inicial añadiendo agua para compensar la evaporación de esta. Para esta operación debe utilizarse agua destilada o desionizada para evitar la formación de sales.

*Adición de los organismos de ensayo*

24. Cuatro o cinco días antes de añadir los organismos de ensayo a los recipientes de ensayo, deben tomarse de los cultivos masas de huevos y ponerlas en recipientes pequeños con medio de cultivo. Puede utilizarse medio viejo del cultivo madre o medio recién preparado. Si se utiliza este último, debe añadírsele una pequeña cantidad de alimento como, por ejemplo, algas verdes o unas gotitas de filtrado de una suspensión finamente molida de alimento para peces en copos (véase el apéndice 2). Solo deben utilizarse masas de huevos recién puestas. Normalmente, las larvas empiezan a salir de los huevos un par de días después de la puesta (de 2 a 3 días en el caso de *Chironomus riparius* a 20 °C y de 1 a 4 días en el de *Chironomus tentans* a 23 °C y en el de *Chironomus yoshimatsui* a 25 °C) y el crecimiento de las larvas tiene lugar en cuatro fases, cada una de entre 4 y 8 días de duración. En el ensayo deben utilizarse larvas de la primera fase (2-3 o 1-4 días tras la eclosión). La fase de los animales puede comprobarse midiendo la anchura de la cápsula cefálica (6).

25. Se asignan aleatoriamente veinte larvas de primera fase a cada recipiente de ensayo que contenga el sedimento enriquecido y el agua, utilizando una pipeta de punta roma. Es necesario detener la aireación del agua mientras se ponen las larvas en los recipientes de ensayo y mantener la situación durante otras 24 horas tras la adición de las larvas (véanse los puntos 24 y 32). Según el diseño de ensayo empleado (véanse los puntos 19 y 20), el número de larvas utilizadas por concentración es de al menos 60 para la estimación puntual de la EC y de 80 para la determinación de la NOEC.

26. A las veinticuatro horas de haber añadido las larvas, se pone la sustancia problema en la columna de agua sobrenadante, y se vuelve a aportar aireación leve. Utilizando una pipeta, se aplican pequeños volúmenes de las soluciones de la sustancia problema por debajo de la superficie del agua. A continuación debe mezclarse el agua sobrenadante, con cuidado de no alterar el sedimento.

*Concentraciones de ensayo*

27. Puede ser útil efectuar un ensayo preliminar para determinar el rango de concentraciones adecuadas para el ensayo definitivo. Con este fin se utiliza una serie de concentraciones de la sustancia problema, muy diferentes entre sí. A fin de proporcionar la misma densidad superficial por quironómido que se vaya a emplear para el ensayo definitivo, se exponen los quironómidos a cada concentración de la sustancia problema durante un plazo que permita la estimación de las concentraciones de ensayo adecuadas, y no hace falta utilizar réplicas.

28. Las concentraciones de ensayo para el ensayo definitivo se deciden sobre la base del resultado del ensayo de determinación del rango de concentraciones. Deben utilizarse al menos cinco concentraciones y seleccionarse como se describe en los puntos 18 a 20.

*Controles*

29. Deben incluirse en el ensayo, con el número adecuado de réplicas, recipientes de control sin sustancia problema pero con sedimento (véanse los puntos 19-20). Si se ha utilizado algún disolvente para aplicar la sustancia problema (véase el punto 16), debe añadirse un control del disolvente en el sedimento.

▼M4

*Sistema de ensayo*

30. Se emplean sistemas estáticos. Pueden utilizarse en casos excepcionales sistemas semiestáticos o dinámicos con renovación intermitente o continua del agua sobrenadante, como, por ejemplo, si las especificaciones de calidad del agua se hacen inadecuadas para el organismo de ensayo o afectan al equilibrio químico (por ejemplo, cuando los niveles de oxígeno disuelto caen demasiado, la concentración de excrementos se eleva demasiado, o se lixivian minerales del sedimento con modificación del pH y/o de la dureza del agua). Sin embargo, normalmente será suficiente y preferible emplear otros métodos de mejora de la calidad del agua sobrenadante, como la aireación.

*Alimentación*

31. Es necesario alimentar a las larvas, de preferencia una vez al día o, al menos, tres veces por semana. Parece adecuada una ración diaria de comida para peces (suspensión en agua o comida finamente molida como, por ejemplo, Tetra-Min o Tetra-Phyll; véanse detalles en el apéndice 2), de 0,25-0,5 mg (0,35-0,5 mg para *C. yoshimatsui*) por larva durante los 10 primeros días. Las larvas de más edad pueden necesitar algo más de comida: entre 0,5 y 1 mg por larva al día debería ser suficiente durante el resto del ensayo. La ración alimentaria debe reducirse en todos los tratamientos y controlarse si se observa crecimiento de hongos o si se aprecia mortalidad en los controles. Si no puede detenerse el desarrollo fúngico, hay que repetir el ensayo. Cuando se someten a ensayo sustancias muy adsorbentes (por ejemplo, con log $K_{ow}$ > 5), o hay sustancias que se unen covalentemente al sedimento, es posible añadir al sedimento artificial, antes del período de estabilización, la cantidad de comida necesaria para garantizar la supervivencia y el crecimiento natural de los organismos. Con este objetivo, debe utilizarse material vegetal en lugar de la comida para peces, por ejemplo, adición de 0,5 % (peso seco) de hojas finamente molidas de ortiga mayor (*Urtica dioica*), morera (*Morus alba*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinaca (*Spinacia oleracea*) u otro material vegetal (*Cerophyl* o alfa-celulosa).

*Condiciones de incubación*

32. Se aporta aireación suave al agua sobrenadante de los recipientes de ensayo, preferentemente a las 24 h de la adición de las larvas, y se continúa a lo largo de todo el ensayo (debe tenerse cuidado para que la concentración de oxígeno disuelto no caiga por debajo del 60 % del valor de saturación en el aire). La aireación se aporta mediante una pipeta Pasteur de vidrio fijada a 2-3 cm por encima del nivel del sedimento, con el ritmo de una o unas pocas burbujas por segundo. Cuando se sometan a ensayo sustancias volátiles, debe considerarse el no airear el sistema sedimento-agua.

33. El ensayo se efectúa a la temperatura constante de 20 °C (± 2 °C). En el caso de *C. tentans* y de *C. yoshimatsui,* las temperaturas recomendadas son de 23 °C y 25 °C (± 2 °C), respectivamente. Se usa un fotoperíodo de 16 h, con una intensidad luminosa de 500 a 1 000 lux.

*Duración de la exposición*

34. La exposición comienza con la adición de larvas a los recipientes enriquecidos y a los de control. La duración máxima del ensayo es de 28 días en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui,* y de 65 días en el de *C. tentans.* Si los dípteros aparecen antes, es posible terminar el ensayo tras un mínimo de cinco días desde la aparición del último adulto en los recipientes de control.

OBSERVACIONES

*Aparición de adultos*

35. Se determinan el tiempo de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras que aparecen completamente. Los machos se identifican fácilmente por sus antenas plumosas.

▼M4

36. Hay que observar los recipientes de ensayo al menos tres veces por semana para hacer una evaluación visual de los eventuales comportamientos anormales (por ejemplo, dejar el sedimento, nadar de forma inusual) respecto al control. Durante el tiempo en que se prevea que ha de ocurrir la aparición es necesario efectuar un recuento diario de los dípteros aparecidos. Se registran cada día el sexo y el número de los dípteros aparecidos completamente. Tras su identificación, se sacan los dípteros de los recipientes. Las eventuales masas de huevos puestas antes de la terminación del ensayo deben anotarse y después retirarse para evitar la reintroducción de larvas en el sedimento. También debe registrarse el número de pupas visibles de las que no han llegado a aparecer adultos. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre la medición de la aparición de los dípteros.

*Crecimiento y supervivencia*

37. Si han de proporcionarse datos sobre la supervivencia y el crecimiento de larvas a los 10 días, deben incluirse desde el principio recipientes de ensayo adicionales, de forma que puedan utilizarse después. El sedimento de estos recipientes adicionales se filtra a través de un tamiz de 250 μm para retener las larvas. Los criterios para determinar la muerte son la inmovilidad o la ausencia de reacción ante un estímulo mecánico. Las larvas no recuperadas deben contarse asimismo como muertas (las larvas que hayan muerto al inicio del ensayo pueden haber sido degradadas por los microbios). Se determina el peso seco (libre de cenizas) de las larvas supervivientes por recipiente de ensayo y se calcula el peso seco individual medio por recipiente. Es útil determinar a qué fase pertenecen las larvas supervivientes; para obtener este dato puede utilizarse la medición de la anchura de la cápsula cefálica de cada individuo.

**Mediciones analíticas**

*Concentración de la sustancia problema*

38. Como mínimo, deben analizarse muestras del agua sobrenadante, del agua intersticial y del sedimento al inicio (preferentemente una hora tras la aplicación de la sustancia problema) y al final del ensayo, a la concentración máxima y a una inferior. Estas determinaciones de la concentración de la sustancia problema informan sobre el comportamiento y el reparto de la sustancia problema en el sistema agua-sedimento. La toma de muestras del sedimento al inicio del ensayo puede influir en el sistema de ensayo (por ejemplo, eliminando larvas del ensayo), por lo que deberían emplearse recipientes de ensayo adicionales para realizar las determinaciones analíticas al inicio y durante el ensayo cuando sea apropiado (véase el punto 39). Puede no ser necesario efectuar mediciones en el sedimento si se ha determinado claramente el reparto de la sustancia problema entre el agua y el sedimento en un estudio agua/sedimento en condiciones comparables (por ejemplo, proporción entre sedimento y agua, tipo de aplicación, contenido en carbono orgánico del sedimento).

39. Cuando se hagan mediciones intermedias (por ejemplo, el día n$^{o}$ 7) y si los análisis necesitan grandes muestras que no puedan tomarse de los recipientes de ensayo sin influir en el sistema de ensayo, las determinaciones analíticas deben llevarse a cabo con muestras de recipientes de ensayo adicionales tratados de la misma manera (incluida la presencia de los organismos de ensayo) pero que no se utilizan para las observaciones biológicas.

40. El procedimiento recomendado para aislar el agua intersticial es la centrifugación, por ejemplo a 10 000 g y 4 °C durante 30 min. Sin embargo, si se demuestra que la sustancia problema no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial debido a que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño.

▼M4

*Parámetros fisicoquímicos*

41. Deben medirse de la manera adecuada el pH, el oxígeno disuelto en el agua de ensayo y la temperatura de los recipientes de ensayo (véase el punto 10). Hay que medir la dureza y el amoníaco en los controles y en un recipiente de ensayo a la concentración máxima, al inicio y al final del ensayo.

DATOS E INFORME

*Tratamiento de los resultados*

42. El objetivo de este ensayo es determinar el efecto de la sustancia problema sobre la tasa de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras completamente aparecidos o, en el caso de los efectos del ensayo de 10 días, sobre la supervivencia y el peso de las larvas. Si no hay ninguna señal de sensibilidades estadísticamente diferentes según los sexos, pueden agruparse los resultados de machos y de hembras a efectos de análisis estadísticos. Las diferencias de sensibilidad entre los sexos pueden evaluarse estadísticamente mediante, por ejemplo, una prueba de tabla de contingencia de $\chi^2$-r × 2 cuadro. Cuando así se requiera, habrá que determinar la supervivencia de las larvas y su peso seco individual medio por recipiente al cabo de 10 días.

43. Las concentraciones que tienen efecto, expresadas como concentraciones en el agua sobrenadante, se calculan preferentemente a partir de las concentraciones medidas al inicio del ensayo (véase el punto 38).

44. A efectos de computar una estimación puntual para la $EC_{50}$ o cualquier otra $EC_x$, las estadísticas por recipiente pueden utilizarse como réplicas verdaderas. Al calcular el intervalo de confianza para cualquier $EC_x$, debe tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes, o bien hay que mostrar que esta variabilidad es tan pequeña que puede despreciarse. Cuando el modelo sigue el método de los mínimos cuadrados, debe aplicarse una transformación estádistica por cada recipiente a fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Sin embargo, los valores de $EC_x$ deben calcularse después de haber vuelto a transformar la respuesta al valor original.

45. Cuando el análisis estadístico se dirige a determinar la NOEC/LOEC mediante contrastes de hipótesis, es necesario tener en cuenta la variabilidad entre recipientes, por ejemplo mediante un análisis de varianza anidado. También puede ser adecuado realizar ensayos más robustos (21) en situaciones en que no se cumplen las hipótesis de los análisis de varianza usuales.

*Tasa de aparición*

46. Las tasas de aparición son datos cuantales y pueden ser analizados por el método de Cochran-Armitage aplicado con ajuste secuencial de residuos cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y estos datos son coherentes con dicha previsión. En caso contrario, puede utilizarse una prueba exacta de Fisher o el método de Mantel-Haenszel con los valores p ajustados según Bonferroni-Holm. Si hay pruebas de que la variabilidad entre réplicas dentro de la misma concentración es mayor de lo que indicaría una distribución binomial (lo que se señala generalmente como variación "extrabinomial"), hay que utilizar un método de Cochran-Armitage o una prueba exacta de Fisher robustos (como se propone en el punto 21).

47. Se determina la suma de dípteros aparecidos por recipiente, $n_e$, y se divide por el número de larvas introducidas, $n_a$:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼**M4**

donde:

$ER$ = tasa de aparición

$n_e$ = número de dípteros aparecidos por recipiente

$n_a$ = número de larvas introducidas por recipiente

48. Otra posibilidad más adecuada para las muestras de gran tamaño, cuando hay variación extrabinomial, consiste en tratar la tasa de aparición como una respuesta continua y emplear procedimientos tales como la prueba de Williams cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y es coherente con estos datos de tasa de aparición. La prueba de Dunnett sería apropiada si no se mantuviera la monotonía. Se define aquí como muestra de gran tamaño la que corresponde a la situación en que tanto el número de dípteros emergidos como el número de no emergidos es superior a cinco, por réplica (recipiente).

49. Para aplicar los métodos de análisis de la varianza, hay que transformar primero los valores de la tasa de aparición mediante la transformación arcoseno de la raíz cuadrada o la transformación de Freeman-Tukey para obtener una distribución normal aproximada y uniformizar las varianzas. Cuando se usan las frecuencias absolutas es posible aplicar el método de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (Bonferroni) o el método de Mantel-Haenszel. La transformación arcoseno de la raíz cuadrada se aplica tomando el arcoseno ($sen^{-1}$) de la raíz cuadrada de la tasa de aparición.

50. Respecto a las tasas de aparición, los valores de $EC_x$ se calculan mediante análisis de regresión (o, por ejemplo, probit (22), logit, Weibull, programas comerciales apropiados, etc.). Si no sirve el análisis de regresión (por ejemplo, cuando hay menos de dos respuestas parciales), se utilizan otros métodos no paramétricos, tales como la media móvil o la interpolación simple).

*Tasa de desarrollo*

51. El tiempo medio de desarrollo corresponde al intervalo medio de tiempo entre la introducción de las larvas (día 0 del ensayo) y la aparición de la cohorte experimental de dípteros (para el cálculo del tiempo de desarrollo verdadero debe tenerse en cuenta la edad de las larvas en el momento de su introducción). La tasa de desarrollo es la inversa del tiempo de desarrollo (unidades: 1/día) y corresponde a la porción de desarrollo larvario que se produce en un día. Es preferible utilizar la tasa de desarrollo para evaluar estos estudios de toxicidad en los sedimentos, ya que su varianza es menor y es más homogénea y próxima a la distribución normal que el tiempo de desarrollo. Por tanto, pueden usarse procedimientos de ensayos paramétricos potentes más con la tasa de desarrollo que con el tiempo de desarrollo. Considerando la tasa de desarrollo como respuesta continua, es posible estimar valores de $EC_x$ mediante análisis de regresión [por ejemplo, (23) (24)].

52. En relación con las siguientes pruebas estadísticas, se supone que el número de dipteros observados en el día de inspección x ha aparecido a la media del intervalo de tiempo entre el día x y el día x - 1 (1 = longitud del intervalo de inspección, que es normalmente de 1 día). La tasa de desarrollo media por recipiente ($x$) se calcula con ayuda de la siguiente fórmula:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

donde:

$\bar{x}$: tasa de desarrollo media por recipiente,

i: índice del intervalo de inspección,

m: número máximo de intervalos de inspección,

▼M4

$f_i$: número de dípteros aparecidos en el intervalo de inspección i,

$n_e$: número total de dípteros aparecidos al final del experimento (= $\sum f_i$),

$x_i$: tasa de desarrollo de los dípteros aparecidos en el intervalo i,

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

donde:

$day_i$: día de inspección (días desde la aplicación),

$l_i$: longitud del intervalo de inspección i (en días, generalmente 1 día).

**Informe del ensayo**

53. El informe del ensayo debe dar, como mínimo, la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas (hidrosolubilidad, presión de vapor, coeficiente de reparto en el suelo (o en el sedimento, si se conoce), estabilidad en el agua, etc.).

— Datos de identificación química (nombre común, nombre químico, fórmula estructural, número CAS, etc.), incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia problema.

*Especie de ensayo:*

— Animales utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría.

— Información sobre la manipulación de las masas de huevos y de las larvas.

— Edad de los animales de ensayo cuando se introducen en los recipientes de ensayo.

*Condiciones de ensayo:*

— Sedimento utilizado, es decir, si es natural o artificial.

— En el caso del sedimento natural, ubicación y descripción del lugar de muestreo del sedimento, incluyendo, si se puede, un historial de la contaminación; características: pH, contenido de carbono orgánico, relación C/N y granulometría (cuando sea apropiado).

— Preparación del sedimento artificial: ingredientes y características (contenido de carbono orgánico, pH, humedad, etc., al inicio del ensayo.

— Preparación del agua de ensayo (si se utiliza agua reconstituida) y características (concentración de oxígeno, pH, conductividad, dureza, etc., al inicio del ensayo).

— Altura del sedimento y del agua sobrenadante.

— Volumen del agua sobrenadante y del agua intersticial, peso del sedimento húmedo con y sin agua intersticial.

— Recipientes de ensayo (material y tamaño).

— Método de preparación de soluciones madre y concentrаčiones de ensayo.

▼M4

— Aplicación de la sustancia problema: concentraciones de ensayo utilizadas, número de réplicas y empleo eventual de disolvente.

— Condiciones de incubación: temperatura, intensidad y ciclo de luz, aireación (frecuencia e intensidad).

— Información detallada sobre la alimentación de los animales, incluidos el tipo de alimento, la preparación, la cantidad y el régimen alimentario.

*Resultados:*

— Concentraciones de ensayo nominales, concentraciones de ensayo medidas y resultados de todos los análisis efectuados para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo.

— Calidad del agua de los recipientes de ensayo, es decir, pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza y amoníaco.

— Sustitución del agua de ensayo evaporada, en su caso.

— Número de dípteros machos y hembras aparecidos por recipiente y por día.

— Número de larvas que no han aparecido como dípteros por recipiente.

— Peso seco individual medio de las larvas por recipiente, y por fase, en caso apropiado.

— Porcentaje de apariciones por réplica y concentración de ensayo (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

— Tasa de desarrollo media de los dípteros aparecidos completamente por réplica y tasa de tratamiento (sin distinguir entre dípteros machos y hembras).

— Estimación de los parámetros de toxicidad como, por ejemplo, $EC_x$ (con intervalos de confianza asociados), NOEC y/o LOEC, y métodos estadísticos empleados para su determinación.

— Discusión de los resultados del ensayo, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

(2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.

(3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp. 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

(6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼M4

(7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

(9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (Hyalella azteca) and midge larvae (Chironomus riparius). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.

(10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in Chironomus yoshimatsui. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345-350.

(11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47-57.

(12) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(13) Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

(14) Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

(15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163-1175.

(16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096-1121.

(18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482-491.

(19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103-117.

(20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510-531.

(21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577-585.

(22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213-221.

(23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

A efectos del presente método, se aplicarán las siguientes definiciones por:

**Sedimento artificial** (o sedimento reconstituido, formulado o sintético): mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

**Agua sobrenadante**: el agua situada sobre el sedimento en el recipiente de ensayo.

**Agua intersticial**: el agua que ocupa el espacio entre el sedimento y las partículas del suelo.

**Agua enriquecida**: el agua a la que se ha añadido sustancia problema.

**Sustancia problema:** toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

▼M4

*Apéndice 2*

**Recomendaciones para el cultivo de *Chironomus riparius***

1. Las larvas de *Chironomus* pueden criarse en cristalizadores o en recipientes más grandes. Sobre el fondo del recipiente se extiende arena de cuarzo fina, en una capa delgada de unos 5 a 10 mm de espesor. Se ha comprobado que la tierra de diatomeas (por ejemplo, Merck, Art 8117) también constituye un sustrato adecuado (es suficiente una capa más fina, de muy pocos milímetros). A continuación se añade agua adecuada hasta una altura de varios centímetros. Los niveles deben mantenerse rellenando con agua en la medida necesaria para compensar las pérdidas por evaporación y evitar la desecación. En caso necesario, es posible sustituir el agua. Debe aportarse una aireación suave. Los recipientes de cría de las larvas deben mantenerse en una jaula adecuada para evitar que se escapen los adultos. La jaula debe ser lo suficientemente grande como para permitir el enjambrado de los adultos aparecidos, ya que en caso contrario puede que no haya copulación (las dimensiones mínimas son de unos 30 × 30 × 30 cm).

2. Las jaulas deben mantenerse a temperatura ambiente o en una zona de ambiente constante a 20 ± 2 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz (de intensidad alrededor de 1 000 lux) y 8 horas de oscuridad. Se ha comunicado que una humedad relativa del aire de menos del 60 % puede impedir la reproducción.

**Agua de dilución**

3. Puede emplearse cualquier agua natural o sintética que sea adecuada. Se suelen utilizar agua de pozo, agua del grifo desclorada y medios artificiales (como, por ejemplo, medio M4 o M7 de Elendt, véase más abajo). Es necesario airear el agua antes de emplearla. En caso necesario, el agua de cultivo puede renovarse sacando cuidadosamente, por vertido o con sifón, el agua usada de los recipientes de cultivo, sin destruir los tubos de las larvas.

**Alimentación de las larvas**

4. Las larvas de *Chironomus* deben alimentarse con comida para peces en copos (Tetra Min®, Tetra Phyll® u otra marca similar de comida comercial para peces), al ritmo de aproximadamente 250 mg por recipiente al día. Puede administrarse como polvo molido seco o como suspensión en agua: se añade 1,0 g de comida en copos a 20 ml de agua de dilución y se mezcla para obtener un resultado homogéneo. Esta preparación puede administrarse al ritmo de unos 5 ml por recipiente al día y ha de agitarse antes de usarse. Las larvas más viejas pueden recibir más cantidad.

5. La alimentación se ajusta según la calidad del agua. Si el medio de cultivo se pone turbio, hay que reducir la alimentación. Es necesario supervisar cuidadosamente la adición de comida. Si la comida es demasiado escasa, se provocará la emigración de las larvas hacia la columna de agua, mientras que si es excesiva aumentará la actividad microbiana y se reducirá la concentración de oxígeno. Ambas situaciones pueden producir un descenso de la tasa de crecimiento.

6. Es posible añadir también algunas células de algas verdes (como, por ejemplo, *Scenedesmus subspicatus, Chlorella vulgaris*) cuando se establecen recipientes de cultivo nuevos.

**Alimentación de los adultos aparecidos**

7. Algunos experimentadores han sugerido que un disco de algodón empapado en una solución saturada de sacarosa puede servir de alimento para los adultos aparecidos.

▼M4

**Aparición de adultos**

8. A 20 ± 2 °C, los adultos empiezan a aparecer en los recipientes de cría de larvas a los 13-15 días aproximadamente. Los machos se distinguen fácilmente porque tienen antenas plumosas.

**Masas de huevos**

9. Una vez haya adultos en la jaula de cría, deben supervisarse todos los recipientes de cría de larvas tres veces por semana para observar la puesta de masas gelatinosas de huevos. Cuando se encuentren, las masas de huevos deben retirarse cuidadosamente y transferirse a una pequeña placa que contenga una muestra del agua de cría. Las masas de huevos se emplean para iniciar un nuevo recipiente de cultivo (por ejemplo, 2-4 masas de huevos por recipiente) o para los ensayos de toxicidad.

10. Las larvas en primer estadio deben salir de los huevos al cabo de 2 – 3 días.

**Establecimiento de nuevos recipientes de cultivo**

11. Cuando se hayan establecido los cultivos, debe ser posible establecer un nuevo recipiente de cultivo de larvas cada semana o con menos frecuencia, según los requisitos de cultivo, eliminando los recipientes más viejos una vez han aparecido los dípteros adultos. Con este sistema, se obtendrá un suministro regular de adultos, con una gestión mínima.

**Preparación de las soluciones de ensayo M4 y M7**

12. Elendt (1990) describió el medio M4. El M7 se prepara como el medio M4, salvo en lo relativo a las sustancias indicadas en el cuadro 1, cuyas concentraciones son cuatro veces más bajas en el medio M7 que en el M4. Se está preparando una publicación sobre el medio M7 (Elendt, comunicación personal). La solución de ensayo no debe prepararse siguiendo a Elendt y Bias (1990), ya que no son adecuadas las concentraciones de $NaSiO_3$ 5 $H_2O$, $NaNO_3$, $KH_2PO_4$ y $K_2HPO_4$ dadas para la preparación de las soluciones madre.

**Preparación del medio M7**

13. Las soluciones madre (I) se preparan por separado cada una y a partir de ellas se prepara una solución madre combinada (II) (véase el cuadro 1). Se toman 50 ml de la solución madre combinada (II) junto con las cantidades de solución madre de cada macronutriente que se dan en el cuadro 2 y se enrasa a 1 litro con agua desionizada para preparar el medio M7. Se prepara una solución madre de vitaminas añadiendo tres vitaminas a agua desionizada como se indica en el cuadro 3, y se añaden al medio M7 final 0,1 ml de la solución madre de vitaminas combinadas, poco antes de su empleo (la solución madre de vitaminas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas). El medio se airea y se estabiliza.

*Cuadro 1*

**Soluciones madre de oligoelementos para los medios M4 y M7**

| Soluciones madre (I) | Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada | Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada | | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ [1] | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ [1] | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl [1] | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |

▼**M4**

| Soluciones madre (I) | Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada | Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada | | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| Na2EDTA $\cdot 2\ H_2O$ (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| FeSO4 $\cdot 7\ H_2O$ (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Estas sustancias difieren en M4 y M7, como se indica más arriba.
(2) Estas soluciones se preparan por separado y después se juntan y se pasan por el autoclave inmediatamente.

*Cuadro 2*

**Soluciones madre de macronutrientes para los medios M4 y M7**

| | Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg) | Cantidad de soluciones madre de macronutrientes añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l) | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| $NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$ | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼**M4**

*Cuadro 3*

**Solución madre de vitaminas para los medios M4 y M7**

Las tres soluciones de vitaminas se combinan para formar una única solución madre de vitaminas.

| | Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg) | Cantidad de solución madre de vitaminas añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l) | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Clorhidrato de tiamina | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cianocobalamina (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotina | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

*BIBLIOGRAFÍA:*

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H.Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25-33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna. Water Research* 24 (9): 1157-1167.

▼M4

*Apéndice 3*

*PREPARACIÓN DEL SEDIMENTO ARTIFICIAL*

**Composición del sedimento**

La composición del sedimento artificial debe ser la siguiente:

| Componente | Características | % de sedimento en peso seco |
|---|---|---|
| Turba | Turba esfágnea, de pH lo más próximo posible a 5,5-6,0, sin restos vegetales visibles, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada al aire | 4-5 |
| Arena de cuarzo | Granulometría: > 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50-200 μm | 75-76 |
| Caolín | Contenido en caolinita ≥ 30 % | 20 |
| Carbono orgánico | Ajustado mediante adición de turba y arena | 2 (± 0,5) |
| Carbonato de calcio | $CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro | 0,05 - 0,1 |
| Agua | Conductividad ≤ 10 μS/cm | 30 - 50 |

**Preparación**

La turba se seca al aire y se tritura hasta convertirse en un polvo fino. Se prepara en agua desionizada una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba, utilizando un dispositivo de homogeneización de prestaciones elevadas. El pH de esta suspensión se ajusta a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. La suspensión se deja durante al menos dos días con agitación suave a 20 ± 2 °C, para estabilizar el pH e implantar un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH, que debe quedar a 6,0 ± 0,5. A continuación se mezcla la suspensión de turba con los demás componentes (arena y caolín) y con agua desionizada para obtener un sedimento homogéneo con un contenido de agua del 30-50 % del peso seco del sedimento. Se vuelve a medir el pH de la mezcla final y se ajusta a 6,5-7,5 con $CaCO_3$ en caso necesario. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido en carbono orgánico. Se recomienda a continuación que el sedimento artificial, antes de emplearse en el ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo.

**Almacenamiento**

Los componentes secos utilizados para preparar el sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente. El sedimento (húmedo) ya preparado no debe almacenarse antes de su empleo en el ensayo. Debe utilizarse inmediatamente tras el tiempo de acondicionamiento de 7 días con que termina su preparación.

*BIBLIOGRAFÍA:*

Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial MEDIA. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10-20.

▼**M4**

*Apéndice 4*

**Características químicas aceptables del agua de dilución**

| Sustancia | Concentraciones |
|---|---|
| Materia en partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Dureza expresada en $CaCO_3$ | < 400 mg/l (*) |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

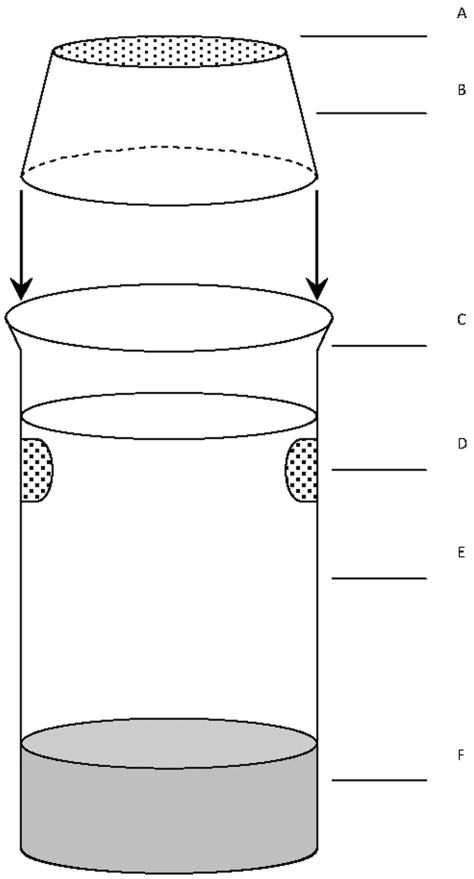
(*) Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt).

▼**M4**

*Apéndice 5*

**Orientaciones para el seguimiento de la aparición de las larvas de quironómidos**

Se ponen trampas de aparición en los vasos del ensayo. Estas trampas tienen que mantenerse desde el día 20 hasta el final del ensayo. A continuación figura el esquema de un ejemplo de trampa:




A: tamiz de nailon

B: tazas de plástico invertidas

C: vaso de exposición sin pico

D: mirilla de tamiz para intercambio de agua

E: agua

F: sedimento

▼M4

## C.29. BIODEGRADABILIDAD FÁCIL—$CO_2$ EN RECIPIENTES SELLADOS (ENSAYO DEL ESPACIO DE CABEZA)

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 310 (2006). El presente método de ensayo es un método exploratorio para la evaluación de la biodegradabilidad fácil de las sustancias y aporta información similar a los seis métodos de ensayo descritos en el capítulo C.4-A a F del presente anexo. Por tanto, una sustancia que tenga resultados positivos con el presente método de ensayo puede considerarse fácilmente biodegradable y, en consecuencia, rápidamente degradable en el medio ambiente.

2. Normalmente, la primera opción para someter a ensayo las sustancias poco solubles y las que se adsorben mucho ha sido el reconocido método del dióxido de carbono ($CO_2$) (1), basado en el ensayo original de Sturm (2) para evaluar la biodegradabilidad de las sustancias orgánicas, mediante la medición del dióxido de carbono producido por la acción microbiana. También se ha elegido para sustancias solubles (pero no volátiles), ya que el desprendimiento de dióxido de carbono es ampliamente considerado como la única prueba inequívoca de actividad microbiana. La eliminación del carbono orgánico disuelto puede verse afectada por procesos fisicoquímicos, como la adsorción, la volatilización, la precipitación o la hidrólisis, así como por la actividad microbiana, y son muchas las reacciones no biológicas que consumen oxígeno, mientras que es raro que se produzca $CO_2$ a partir de sustancias orgánicas de forma abiótica. En el ensayo de Sturm, tanto original como modificado (1) (2), el $CO_2$ pasa de la fase líquida a los recipientes absorbentes por arrastre (es decir, burbujeando aire tratado a través del medio líquido para eliminar el $CO_2$), mientras que en la versión de Larson (3) (4) el $CO_2$ se transfiere desde el recipiente de reacción a los absorbentes pasando aire exento de $CO_2$ a través del espacio de cabeza y, de forma adicional, sacudiendo continuamente el recipiente de ensayo. El recipiente de reacción se sacude solo en la modificación de Larson; la agitación se especifica solo para sustancias insolubles en la norma ISO 9439 (5) y en la versión original de EE. UU. (6), y en estas dos normas se especifica el arrastre en lugar de la sustitución del espacio de cabeza. En otro método oficial de la EPA norteamericana (7), basado en el método de Gledhill (8), el recipiente de reacción sacudido está cerrado a la atmósfera y el $CO_2$ producido se recoge en una trampa alcalina interna directamente desde la fase gaseosa, como en los frascos del respirómetro clásico de Warburg/Barcroft.

3. Sin embargo, se ha demostrado que se acumula carbono inorgánico (CI) en el medio durante la aplicación del ensayo de Sturm normal y modificado a una serie de sustancias (9). Durante la degradación de 20 mg C/l de anilina se encontró una concentración de CI de hasta 8 mg/l. Así pues, la recogida de $CO_2$ en las trampas alcalinas no refleja fielmente la cantidad de $CO_2$ producida por los microorganismos en fases intermedias de la degradación. Como resultado, la especificación de que > 60 % de la producción maxima teórica de $CO_2$ ($CO_2$T) debe recogerse dentro de un período de observación de 10 días (los 10 días inmediatamente siguientes a la consecución del 10 % de la biodegradación) para que una sustancia problema se clasifique como fácilmente biodegradable, no se cumplirá en el caso de ciertas sustancias que sí se clasificarían en esa categoría si se utilizara el método de la eliminación del carbono orgánico disuelto (COD).

4. Cuando el porcentaje de degradación es menor que el valor previsto, es posible que se acumule CI en la solución de ensayo. En tales casos, la degradabilidad puede evaluarse con los otros ensayos de biodegrabilidad fácil.

▼M4

5. Otros inconvenientes de la metodología de Sturm (que es engorrosa, exige mucho tiempo, se presta más al error experimental y no es aplicable a las sustancias volátiles) ya antes habían incitado a buscar una técnica de recipiente cerrado, distinta de la Geldhill, en lugar del burbujeo de gas (10) (11). Boatman *et al* (12) revisaron los métodos anteriores y adoptaron un sistema de espacio de cabeza cerrado en el que se desprendía el $CO_2$ a ese espacio al final de la incubación, al acidificar el medio. El $CO_2$ se midió analizando el carbono inorgánico mediante cromatografía de gases (GC) en muestras tomadas de forma automática en el espacio de cabeza, pero sin tener en cuenta el carbono inorgánico disuelto (CID) en la fase líquida. Además, los recipientes empleados eran muy pequeños (20 ml), con tan solo 10 ml de medio, lo que provocaba problemas, por ejemplo cuando se añadían las cantidades necesariamente muy pequeñas de sustancias problema insolubles, o en el medio inoculado podía no haber microorganismos competentes (o no haberlos en número suficiente) para degradar las sustancias problema.

6. Estas dificultades se han vencido mediante los estudios independientes de Struijs y Stoltenkamp (13) y de Birch y Fletcher (14), el último de los cuales se inspiró en su experiencia con los aparatos utilizados en el ensayo de degradación anaeróbica (15). En el primer método (13) se mide el $CO_2$ en el espacio de cabeza tras acidificación y equilibrado, mientras que en el segundo (14) el CID se mide tanto en la fase gaseosa como en la líquida, sin tratamiento; más del 90 % del CI formado se encontraba en la fase líquida. Ambos métodos aventajan al ensayo de Sturm en el sentido de que su sistema de ensayo es más compacto y manejable, es posible utilizarlos con sustancias químicas y evitan la posibilidad de retrasos en la medición del $CO_2$ producido.

7. Los dos enfoques se combinaron en la norma ISO sobre el $CO_2$ en el espacio de cabeza (16), que se sometió a un estudio interlaboratorios (17), y es esta norma la que forma la base del presente método de ensayo. De forma similar, los dos enfoques se han utilizado en el método de la EPA de EE. UU. (18). Se han recomendado dos métodos de medición del $CO_2$, a saber, el $CO_2$ en el espacio de cabeza previa acidificación (13) y el CI en la fase líquida tras la adición de un exceso de álcali. Este último método fue introducido por Peterson durante el ensayo interlaboratorios CONCAWE (19) de este método de espacio de cabeza modificado para medir la biodegradabilidad intrínseca. Los cambios efectuados en la revisión de 1992 (20) de los métodos del capítulo C.4 del presente anexo para estudiar la biodegradabilidad fácil se han incorporado al presente método de ensayo, de forma que, por lo demás, las condiciones (medio, duración, etc.) son las mismas que en el ensayo revisado de Sturm (20). Birch y Fletcher (14) han señalado que con este ensayo de espacio de cabeza se obtenían resultados muy similares a los obtenidos con las mismas sustancias en el ensayo interlaboratorios de la OCDE (21) de los métodos de ensayo revisados.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

8. La sustancia problema, normalmente a la concentración de 20 mg C/l, como única fuente presente de carbono y de energía, se incuba en un medio amortiguador de sales minerales que se ha inoculado con una población mixta de microorganismos. El ensayo se lleva a cabo en frascos cerrados con un espacio de cabeza lleno de aire, que aporta una reserva de oxígeno para la biodegradación aerobia. El desprendimiento de $CO_2$ derivado de la degradación aerobia final de la sustancia problema se determina midiendo el CI producido en los frascos de ensayo en exceso respecto al producido en los recipientes en blanco que contienen solamente medio inoculado. El grado de biodegradación se expresa en porcentaje de la producción máxima teórica de CI (CITe), sobre la base de la cantidad de sustancia problema (en carbono orgánico) añadida inicialmente.

9. También puede medirse la eliminación del COD y/o el grado de biodegradación primaria de la sustancia problema (20).

▼M4

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

10. Es preciso conocer el contenido de carbono orgánico (% p/p) de la sustancia problema, bien por su estructura química o bien por medición, de forma que sea posible calcular el porcentaje de degradación. En el caso de las sustancias problema volátiles, es útil disponer de la constante de la ley de Henry, medida o calculada, para determinar una relación adecuada entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido. También es conveniente disponer de información sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos a la hora de seleccionar una concentración de ensayo adecuada y para interpretar los resultados que indiquen escasa biodegradabilidad: se recomienda incluir un control de la inhibición salvo que se sepa que la sustancia problema no es inhibidora de la actividad microbiana (véase el punto 24).

APLICABILIDAD DEL MÉTODO

11. El ensayo es aplicable a las sustancias problema hidrosolubles e insolubles, aunque debe velarse por conseguir una buena dispersión de la sustancia problema. Utilizando la relación recomendada entre volumen del espacio de cabeza y volumen del líquido de 1:2, las sustancias volátiles con una constante de la ley de Henry de hasta 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$ pueden someterse a ensayo, ya que la proporción de la sustancia problema en el espacio de cabeza no superará el valor del 1 % (13). Puede utilizarse un volumen menor del espacio de cabeza cuando se estudien sustancias que sean más volátiles pero cuya biodisponibilidad pueda ser limitante, en particular si son poco solubles en agua. Sin embargo, los usuarios deben velar por que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido y la concentración de la sustancia problema sean tales que se disponga de suficiente oxígeno para que pueda darse una biodegradación aerobia completa (es decir, evitar el uso de una concentración elevada de sustrato y un pequeño volumen del espacio de cabeza). Pueden encontrarse orientaciones sobre esta cuestión en las referencias 13 y 23.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

12. Para comprobar el procedimiento del ensayo, debe someterse al mismo, en paralelo, una sustancia de referencia de biodegradabilidad conocida. A estos efectos, pueden utilizarse anilina, benzoato de sodio o etilenglicol para el ensayo de sustancias problema hidrosolubles, y 1-octanol para el de sustancias problema poco solubles (13). La biodegradación de estas sustancias debe llegar a > 60 % del CITe en el plazo de 14 días.

REPRODUCIBILIDAD

13. En el ensayo interlaboratorios del método (17), se obtuvieron los siguientes resultados aplicando las condiciones recomendadas, incluida la concentración de 20 mg C de sustancia problema por litro.

| Sustancia problema | Porcentaje medio de biodegradación (28 d) | Coeficiente de variación (%) | Número de laboratorios |
|---|---|---|---|
| Anilina | 90 | 16 | 17 |
| 1-Octanol | 85 | 12 | 14 |

La variabilidad dentro del ensayo (reproducibilidad), utilizando anilina, era baja, con coeficientes de variabilidad no superiores al 5 % en casi todas las tandas de ensayos. En los dos casos en que la reproducibilidad era peor, la mayor variabilidad se debía probablemente a la alta producción de CI en las pruebas en blanco. La reproducibilidad era peor con el 1-octanol, pero aún así era menor del 10 % en el 79 % de las tandas de ensayos. Esta mayor variabilidad dentro del ensayo puede haberse debido a errores en la dosificación, ya que es necesario inyectar pequeños volúmenes (de 3 a 4 μl) de 1-octanol en frascos de ensayo sellados. Se encuentran mayores coeficientes de variación cuando se emplean concentraciones menores de sustancia problema, especialmente concentraciones inferiores a 10 mg C/l. Esto puede superarse parcialmente reduciendo la concentración de carbono inorgánico total (CIT) en el inóculo.

▼**M4**

14. En un ensayo interlaboratorios de la UE (24) de cinco agentes tensioactivos a la concentración de 10 mg de C/l se obtuvieron los siguientes resultados:

| Sustancia problema | Porcentaje medio de biodegradación (28 d) | Coeficiente de variación (%) | Número de laboratorios |
|---|---|---|---|
| Tetrapropileno-benceno-sulfonato | 17 | 45 | 10 |
| Di-iso-octilsulfo-succinato (aniónico) | 72 | 22 | 9 |
| Cloruro de hexadecil-trimetilamonio (*) (catiónico) | 75 | 13 | 10 |
| Iso-nonilfenol -(etoxilato)$_9$ (no iónico) | 41 | 32 | 10 |
| Coco-amida-propil dimetilhidroxi sulfobetaína (anfótera) | 60 | 23 | 11 |

(*) Se añade $SiO_2$ para neutralizar la toxicidad.

Los resultados indican que, en general, la variabilidad era mayor con los agentes tensioactivos menos degradados. La variabilidad dentro del ensayo era inferior al 15 % en más del 90 % de los casos, y los valores máximos llegaban al 30-40 %.

NOTA: La mayoría de los agentes tensioactivos no son especies moleculares únicas sino mezclas de isómeros, homólogos, etc., que se degradan tras períodos de latencia característicos diferentes y con tasas cinéticas diferentes, lo que se plasma en curvas atenuadas, "borrosas", de forma que el valor de corte del 60 % puede no ser alcanzado dentro del período de observación de 10 días, incluso aunque cada especie molecular individual superara ese valor en el plazo de 10 días si se ensayara sola. Esto puede observarse también con otras mezclas complejas.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

*Equipo*

15. Equipo normal de laboratorio, además de lo siguiente:

a) Frascos de suero de vidrio, cerrados con tapones de caucho butílico y cápsulas de aluminio. El tamaño recomendado es de "125 ml", con un volumentotal de unos 160 ml (en este caso, es necesario saber que el volumen de cada frasco es de 160 ± 1 ml). Puede emplearse un tamaño menor de recipiente cuando los resultados cumplen las condiciones descritas en los puntos 66 y 67.

b) Analizador de carbono u otro instrumento (por ejemplo, cromatógrafo de gases) para medir el carbono inorgánico.

▼M4

c) Jeringas de alta precisión para tomar muestras gaseosas y líquidas.

d) Agitador orbital en un ambiente de temperatura controlada.

e) Aporte de aire exento de $CO_2$; puede prepararse haciendo pasar aire a través de gránulos de cal sodada o utilizando una mezcla gaseosa con 80 % $N_2$/20 % $O_2$ (opcional) (véase el punto 28).

f) Dispositivo de filtración por membrana de 0,20-0,45 μm de porosidad (opcional).

g) Analizador de carbono orgánico (opcional).

*Reactivos*

16. Deben utilizarse siempre reactivos de pureza analítica.

*Agua*

17. Debe utilizarse agua destilada o desionizada, con ≤ 1 mg/l de carbono orgánico total. Esto corresponde a ≤ 5 % del contenido de carbono orgánico inicial introducido por la dosis recomendada de la sustancia problema.

*Soluciones madre para el medio de sales minerales*

18. Las soluciones madre y el medio de sales minerales son similares a los de los ensayos de la norma ISO 14593 (16) y del capítulo C.4 "biodegradabilidad fácil" (20). El uso de una concentración superior de cloruro de amonio (2,0 g/l en lugar de 0,5 g/l) debe ser necesario solo en casos muy excepcionales como, por ejemplo, cuando la concentración de la sustancia problema es > 40 mg C/l. Las soluciones madre deben conservarse refrigeradas y se eliminarán al cabo de seis meses, o antes si aparecen signos de precipitación o de crecimiento microbiano. Deben prepararse los seis frascos siguientes:

a) Fosfato de dihidrógeno y potasio ($KH_2PO_4$) 8,50 g

Fosfato de hidrógeno y dipotasio ($K_2HPO_4$) 21,75 g

Fosfato de hidrógeno y disodio dihidratado ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g

Cloruro de amonio ($NH_4Cl$) 0,50 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro. El pH de esta solución debe ser 7,4 (± 0,2). Si no es así, debe prepararse una solución nueva.

b) Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

c) Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro.

d) Cloruro de hierro (III) hexahidratado ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g

Disolver en agua y enrasar a 1 litro; añadir una gota de HCl concentrado.

*Preparación del medio mineral*

19. Se mezclan 10 ml de la solución a) con unos 800 ml de agua (véase el punto 17), se añade a continuación 1 ml de las soluciones b), c) y d) y se enrasa a 1 litro con agua (punto 17).

*Otros reactivos*

20. Ácido ortofosfórico concentrado ($H_3PO_4$) (> 85 %, peso en volumen).

▼M4

*Solución de hidróxido de sodio 7M*

21. Se disuelven 280 g de hidróxido de sodio (NaOH) en 1 litro de agua (punto 17). Se determina la concentración de CID de esta solución y se tiene en cuenta este valor cuando se calcule el resultado del ensayo (véanse los puntos 55 y 61), especialmente en función del criterio de validez del punto 66 b). Si la concentración de CID es demasiado elevada, debe prepararse una solución nueva.

*Sustancia problema*

22. Preparar una solución madre de una sustancia problema suficientemente hidrosoluble, en agua (punto 17) o en el medio de ensayo (punto 19), a una concentración preferiblemente 100 veces mayor que la concentración final que se vaya a emplear en el ensayo; puede ser necesario ajustar el pH de la solución madre. La solución madre debe añadirse al medio mineral para conseguir una concentración final de carbono orgánico entre 2 y 40 mg C/l, preferiblemente 20 mg C/l. Si se utilizan concentraciones menores que estas, la precisión obtenida puede verse afectada. Las sustancias líquidas solubles e insolubles pueden añadirse a los recipientes directamente mediante jeringas de precisión. Puede ser necesario aplicar un tratamiento especial a las sustancias problema poco solubles o insolubles (25). Las opciones son las siguientes:

a) adición directa de cantidades pesadas conocidas;

b) dispersión con ultrasonidos antes de la adición;

c) dispersión con ayuda de agentes emulgentes, de los que se determinará si tienen algún efecto inhibidor o estimulante de la actividad microbiana antes de añadir la sustancia problema;

d) adsorción de sustancias problema líquidas, o de una solución en un disolvente volátil adecuado, a un medio o soporte inerte (por ejemplo, filtro de fibras de vidrio), seguida de evaporación del disolvente eventualmente empleado, y adición directa de cantidades conocidas;

e) adición de un volumen conocido de una solución de la sustancia problema en un disolvente muy volátil a un recipiente de ensayo vacío, seguido de evaporación del disolvente.

Hay que someter a ensayo los agentes o disolventes utilizados en las letras c), d) y e) para comprobar si tienen efecto estimulante o inhibidor sobre la actividad microbiana [véase el punto 42 b)].

*Sustancia de referencia*

23. Preparar una solución madre de la sustancia de referencia (soluble) en agua (punto 17), a una concentración de preferencia 100 veces mayor que la concentración final que se vaya a emplear en el ensayo (20 mg C/l).

*Comprobación de la inhibición*

24. Es frecuente que las sustancias problema no muestren degradación significativa en las condiciones aplicadas en las evaluaciones de la biodegradación fácil. Una de las posibles causas es que la sustancia problema sea inhibidora para el inóculo a la concentración a la que se aplica en el ensayo. Puede incluirse en el diseño del ensayo una comprobación de la inhibición para facilitar la identificación (*a posteriori*) de la inhibición como posible causa o factor contribuyente. Por el contrario, la comprobación de la inhibición puede excluir tales interferencias y mostrar que la degradación nula o escasa debe atribuirse solo a que los microorganismos no son capaces de atacar la sustancia en la condiciones del ensayo. A fin de obtener información sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos (aerobios), preparar una solución del medio de ensayo con la sustancia problema y la sustancia de referencia (punto 19), cada una a las mismas concentraciones que se añaden en el ensayo en sí (véanse los puntos 22 y 23).

▼M4

*Inóculo*

25. El inóculo puede obtenerse de diversas fuentes: lodo activado, efluente de aguas residuales (no cloradas), aguas superficiales y suelos, o de una mezcla de estas (20). La actividad biodegradante de la fuente debe comprobarse utilizando una sustancia de referencia. Independientemente de la fuente, no deben utilizarse microorganismos que se hayan expuesto anteriormente a la sustancia problema, si se quiere emplear el procedimiento como ensayo de la biodegradabilidad fácil.

Advertencia: Hay que manejar con cuidado el lodo activado, las aguas residuales y los efluentes de aguas residuales, debido a su contenido en organismos patógenos.

26. Según la experiencia, el volumen óptimo del inóculo es aquel que:

— resulta suficiente para dar una actividad de biodegradación adecuada,

— degrada la sustancia de referencia en el porcentaje estipulado (véase el punto 66),

— da entre $10^2$ y $10^5$ unidades formadoras de colonias por mililitro en la mezcla final,

— da normalmente una concentración de 4 mg/l de sólidos en suspensión en la mezcla final cuando se utiliza lodo activado; es posible emplear concentraciones de hasta 30 mg/l, pero pueden aumentar significativamente la producción de $CO_2$ de los blancos (26),

— contribuye con menos del 10 % de la concentración inicial de carbono orgánico introducido por la sustancia problema,

— se encuentra generalmente en la banda de 1 a 10 ml de inóculo por litro de solución de ensayo.

*Lodo activado*

27. Se recoge, justo antes del proceso, lodo activado del depósito de aireación de una depuradora de aguas residuales o de una instalación de laboratorio que trate predominantemente aguas residuales domésticas. En caso necesario, deben retirarse las partículas gruesas por tamizado (por ejemplo, con un tamiz de 1 $mm^2$ de malla) y el lodo ha de mantenerse en condiciones aerobias hasta el momento de su utilización.

28. También, después de eliminar las eventuales partículas gruesas, puede dejarse sedimentar o centrifugarse (por ejemplo, 1 100 × g durante 10 min). Se desecha el sobrenadante. El lodo puede lavarse en la solución de minerales. Se suspende el lodo concentrado en medio mineral para obtener una concentración de 3 a 5 g de sólidos en suspensión/1 y después se somete a aireación hasta que se utilice.

29. El lodo debería obtenerse de una depuradora convencional que trabaje adecuadamente. Si el lodo tiene que obtenerse de una depuradora de elevado rendimiento o se piensa que contiene inhibidores, debería lavarse. El lodo resuspendido se mezcla bien y a continuación se deja sedimentar o se centrifuga, se desecha el sobrenadante y se vuelve a suspender el lodo lavado en otro volumen de medio mineral. Este procedimiento se repite hasta que se considere que el lodo queda exento de un exceso de sustrato o de inhibidor.

30. Después de conseguir la resuspensión completa, o con el lodo sin tratar, se toma una muestra justo antes de su utilización para determinar el peso seco de los sólidos en suspensión.

31. Otra posibilidad diferente es homogeneizar lodo activado (de 3 a 5 g de sólidos suspendidos/1). Se trata el lodo en un mezclador Waring durante 2 minutos a velocidad media. El lodo mezclado se deja sedimentar durante 30 minutos, o más en caso necesario, y se decanta el líquido para utilizarlo como inóculo en la proporción de unos 10 mg/l de medio mineral.

▼M4

32. Puede conseguirse una reducción aún mayor del desprendimiento de $CO_2$ en el blanco aireando el lodo hasta el día siguiente con aire exento de $CO_2$. Utilizar como concentración del inóculo en este ensayo 4 mg/l de sólidos del lodo activado (13).

*Efluente secundario de aguas residuales*

33. El inóculo puede obtenerse también a partir del efluente secundario de una depuradora o de una instalación de laboratorio que reciba predominantemente aguas residuales domésticas. Mantener la muestra en condiciones aerobias y utilizarla el día de la toma, o acondicionarla previamente en caso necesario. El efluente debe filtrarse por un filtro grueso para eliminar las partículas gruesas y se mide el valor del pH.

34. Para reducir su contenido de CI, se hace pasar por el filtrado aire exento de $CO_2$ (punto 15, letra e) durante 1 h, manteniendo el pH a 6,5 mediante el uso de ácido ortofosfórico (punto 20). El valor del pH se restaura a su valor original con hidróxio de sodio (punto 21) y, después de dejar sedimentar durante 1 h aproximadamente, se toma un volumen adecuado del sobrenadante para la inoculación. Este procedimiento de arrastre reduce el contenido de CI del inóculo. Por ejemplo, cuando se utilizaba como inóculo el volumen recomendado máximo de efluente sometido al arrastre y filtrado (100 ml) por litro, la cantidad de CI presente en los recipientes de control en blanco estaba en la banda de 0,4-1,3 mg/l (14), lo que correspondía a entre el 2 y el 6,5 % del C de la sustancia problema a 20 mg C/l y entre el 4 y el 13 % a 10 mg C/l.

*Aguas superficiales*

35. Se toma una muestra de un agua superficial adecuada. Debe mantenerse en condiciones aerobias y utilizarse el mismo día de la toma. En caso necesario, la muestra debe concentrarse por filtración o centrifugación. El volumen de inóculo que se vaya a utilizar en cada recipiente de ensayo debe cumplir los criterios del punto 26.

*Suelos*

36. Se toma una muestra de un suelo adecuado, recogida a una profundidad de hasta 20 cm por debajo de la superficie del suelo. Hay que retirar las piedras, restos vegetales e invertebrados de la muestra de suelo antes de pasarla por un tamiz de 2 mm de malla (si la muestra está demasiado húmeda para tamizarla inmediatamente, se deja secar parcialmente al aire para facilitar el tamizado). Debe mantenerse en condiciones aerobias y utilizarse el mismo día de la toma; si la muestra se transporta en una bolsa de polietileno negra sin cerrar completamente, puede conservarse en la bolsa hasta un mes a una temperatura de entre 2 y 4 °C.

*Preacondicionamiento del inóculo*

37. Los inóculos pueden estar preacondicionados a las condiciones experimentales, pero no preadaptados a la sustancia problema. El preacondicionamiento puede reducir el desprendimiento de $CO_2$ del blanco. El preacondicionamiento consiste en airear el lodo activado, tras diluirlo en el medio de ensayo hasta una concentración de 30 mg/l, con aire húmedo exento de $CO_2$ durante un máximo de 5 o 7 días a la temperatura del ensayo.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

*Número de frascos*

38. El número de frascos [punto 15, letra a)] necesarios para un ensayo dependerá de la frecuencia de los análisis y de la duración del ensayo.

39. Se recomienda analizar frascos por triplicado tras un número suficiente de intervalos de tiempo, de forma que pueda señalarse el período de observación de 10 días. También se analizan al final del ensayo al menos cinco frascos de ensayo [punto 15, letra a)] de los conjuntos a), b) y c) (véase el punto 42), para permitir el cálculo de los intervalos de confianza del 95 % del valor medio del porcentaje de biodegradación.

▼M4

*Medio inoculado*

40. El inóculo se emplea a la concentración de 4 mg/l de sólidos secos del lodo activado. Preparar inmediatamente antes del uso una cantidad suficiente de medio inoculado añadiendo, por ejemplo, 2 ml de lodo activado tratado de forma adecuada (puntos 27 a 32) a la concentración de 2 000 mg/l a 1 litro de medio de sales minerales (punto 19). Cuando deba utilizarse efluente secundario de aguas residuales, añadir hasta 100 ml de efluente (punto 33) a 900 ml de medio de sales minerales (punto 19) y enrasar a 1 litro con medio.

*Preparación de los frascos*

41. Se ponen en frascos replicados alícuotas de medio inoculado para obtener una relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido de 1:2 (por ejemplo, añadir 107 ml a frascos de 160 ml de capacidad). Es posible utilizar otras proporciones, pero téngase en cuenta la advertencia del punto 11. Independientemente del tipo de inóculo utilizado, ha de ponerse atención para que el medio inoculado se mezcle adecuadamente a fin de garantizar que se distribuye de manera uniforme en los frascos de ensayo.

42. Se preparan conjuntos de frascos [punto 15, letra a)] que contengan lo siguiente:

a) recipientes de ensayo (denominados $F_T$) que contengan la sustancia problema;

b) controles en blanco (denominados $F_B$) que contengan el medio de ensayo más el inóculo; deben añadirse también las eventuales sustancias, disolventes, agentes o filtros de fibra de vidrio que se utilicen para introducir la sustancia problema en los recipientes de ensayo;

c) recipientes (denominados $F_C$) para comprobar el procedimiento que contengan la sustancia de referencia;

d) en caso necesario, recipientes (denominados $F_I$) para comprobar un posible efecto inhibidor de la sustancia problema que contengan tanto la sustancia problema como la sustancia de referencia a las mismas concentraciones (punto 24) que se encuentran en los frascos $F_T$ y $F_C$, respectivamente;

e) recipientes (denominados $F_S$) para comprobar una possible degradación abiótica como en la letra a) más 50 mg/l $HgCl_2$ o esterilizados de alguna otra manera (por ejemplo, mediante autoclavado).

43. Las sustancias problema y sustancias de referencia hidrosolubles se añaden como soluciones madre acuosas (puntos 22, 23 y 24) para dar una concentración de entre 10 y 20 mg C/l.

44. Las sustancias problema y sustancias de referencia insolubles se añaden a los frascos de diversas formas [véase el punto 22, letras a) a e)] según la naturaleza de la sustancia problema, bien antes o bien después de la adición del medio inoculado, en función del método de tratamiento de la sustancia problema. Si se aplica uno de los procedimientos indicados en el punto 22, letras a) a e), los frascos en blanco $F_B$ [punto 42, letra b)] deben tratarse de forma similar, pero excluyendo la sustancia problema o la sustancia de referencia.

45. Las sustancias problema volátiles deben inyectarse en frascos sellados (punto 47) mediante una microjeringa. La dosis se calcula a partir del volumen inyectado y de la densidad de la sustancia problema.

46. En caso necesario, se añade agua a los recipientes para obtener el mismo volumen de líquido en cada uno de ellos. Ha de velarse por que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido (normalmente, 1:2) y la concentración de la sustancia problema sean tales que se disponga de suficiente oxígeno en el espacio de cabeza para permitir una biodegradación completa.

▼M4

47. A continuación se sellan todos los frascos, por ejemplo con diafragmas de caucho butílico y cápsulas de aluminio. Las sustancias problema volátiles deben añadirse en esta fase (punto 45). Si ha de seguirse el descenso de la concentración de COD de la solución de ensayo y han de realizarse análisis a tiempo cero para determinar la concentración de CI inicial [controles estériles, punto 42, letra e)] u otros parámetros, tomar una muestra apropiada del recipiente de ensayo. Este recipiente y su contenido se desechan a continuación.

48. Los frascos sellados se colocan en un agitador rotatorio [punto 15, letra d)], con una velocidad de agitación suficiente para mantener el contenido de los frascos bien mezclado y en suspensión (por ejemplo, de 150 a 200 rpm), y se incuban a oscuras y a 20 °C, con una precisión de ± 1 °C.

*Muestreo*

49. El patrón de muestreo dependerá del período de latencia y de la tasa cinética de biodegradación de la sustancia problema. Se toman frascos para analizarlos el mismo día del muestreo, que debe hacerse al menos una vez por semana o con más frecuencia (por ejemplo, dos veces por semana) si hace falta obtener la curva de degradación completa. Se toma del agitador el número necesario de frascos replicados, que correspondan a $F_T$, $F_B$ y $F_C$ y, cuando se utilicen, $F_I$ y $F_S$ (véase el punto 42). El ensayo dura normalmente 28 días. Si la curva de biodegradación indica que se alcanza una meseta antes del día 28, el ensayo puede darse por concluido sin llegar al día 28. Tomar muestras de los cinco frascos reservados para el día 28 del ensayo a fin de analizarlas y utilizar los resultados para calcular los límites de confianza o el coeficiente de variación del porcentaje de degradación. No es necesario tomar con tanta frecuencia como de los demás frascos muestras de los que correspondan a las comprobaciones de la inhibición y de la degradación abiótica; es suficiente con los días 1 y 28.

*Análisis de carbono inorgánico (CI)*

50. La producción de $CO_2$ en los frascos se determina midiendo el aumento de la concentración de carbono inorgánico (CI) durante la incubación. Se dispone de dos métodos recomendados para medir la cantidad de CI producida en el ensayo, y se describen inmediatamente a continuación. Dado que los métodos pueden dar resultados ligeramente diferentes, en cada tanda de ensayos hay que utilizar uno solo.

51. Se recomienda el método a) si resulta probable que el medio contenga restos de, por ejemplo, un papel de filtro de vidrio o sustancia problema insoluble. Este análisis puede realizarse utilizando un cromatógrafo de gases si no se dispone de analizador de carbono. Es importante que los frascos estén a la temperatura del ensayo (o cerca de esta) cuando se analice el gas del espacio de cabeza. El método b) puede ser más fácil para los laboratorios que utilicen analizadores de carbono para medir el CI. Es importante que la solución de hidróxido de sodio (punto 21) utilizada para convertir el $CO_2$ en carbonato sea recién preparada o bien que se conozca su contenido en CI, de forma que este pueda tenerse en cuenta a la hora de calcular los resultados del ensayo [véase el punto 66, letra b)].

*Método a): acidificación a pH < 3*

52. Antes de cada lote de análisis, se calibra el analizador de CI utilizando un patrón adecuado de CI (por ejemplo, $CO_2$ al 1 % p/p en $N_2$). Se inyecta ácido ortofosfórico concentrado (punto 20) a través del diafragma de cada frasco de la muestra para reducir el pH del medio a<3 (por ejemplo, añadir 1 ml a 107 ml de medio de ensayo). Los frascos se vuelven a colocar en el agitador. Tras agitar durante una hora a la temperatura de ensayo, se sacan los frascos del agitador, se retiran alícuotas (por ejemplo, de 1 ml) de gas del espacio de cabeza de cada frasco y se inyectan en el analizador de CI. Las concentraciones medidas de CI se registran en mg C/l.

▼M4

53. El principio del presente método consiste en que, tras la acidificación hasta un pH<3 y la estabilización a 20 °C, la constante de equilibrio para la distribución del $CO_2$ entre las fases líquida y gaseosa de los frascos de ensayo es de 1,0 cuando se mide en concentraciones (13). Es necesario demostrar al menos una vez que esto es así con el sistema de ensayo, de la manera siguiente:

Preparar frascos con 5 y 10 mg/l de CI utilizando una solución de carbonato de sodio anhidro ($Na_2CO_3$) en agua exenta de $CO_2$, obtenida acidificando agua hasta llegar a un pH de 6,5 con ácido ortofosfórico concentrado (punto 20), burbujeando hasta el día siguiente aire exento de $CO_2$ y elevando el pH con álcali hasta llegar a la neutralidad. Asegurarse de que la relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido es la misma que en los ensayos (por ejemplo, de 1:2). Acidificar y equilibrar como se describe en el punto 52, y medir las concentraciones de CI tanto en la fase del espacio de cabeza como en la del líquido. Comprobar que las dos concentraciones son la misma, teniendo en cuenta el error experimental. En caso contrario, el operario debe revisar los procedimientos. No es necesario efectuar esta verificación de la distribución del CI entre las fases líquida y gaseosa cada vez que se realiza el ensayo; en principio puede hacerse durante la calibración.

54. Si se quiere medir la eliminación del COD (solo con sustancias problema hidrosolubles), hay que tomar muestras de la fase líquida de distintos frascos (no acidificados), filtrarlas por membrana e inyectarlas en el analizador de COD. Estos frascos pueden utilizarse en otros análisis en caso necesario, para medir la biodegradación primaria.

*Método b): conversión del $CO_2$ en carbonato*

55. Antes de cada lote de análisis, calibrar el analizador de CI utilizando un patrón adecuado como, por ejemplo, una solución de bicarbonato sódico ($NaHCO_3$) en agua exenta de $CO_2$ (véase el punto 53) en la banda de 0 a 20 mg/l de CI. Inyectar solución de hidróxido de sodio (7 M, punto 21) (por ejemplo, 1 ml en 107 ml de medio) a través del diafragma de cada frasco muestreado; agitar los frascos durante 1 h a la temperatura de ensayo. Usar la misma solución de NaOH en todos los frascos apartados un día determinado, pero no necesariamente en todos los muestreos efectuados a lo largo de un ensayo. Si se necesita conocer los valores absolutos de CI de los blancos en todos los muestreos, será necesario determinar el CI de la solución de NaOH cada vez que se utilice. Sacar los frascos del agitador y dejar reposar. Se retiran con jeringa volúmenes adecuados (por ejemplo, de 50 a 1 000 µl) de la fase líquida de cada recipiente. Las muestras se inyectan en el analizador de CI y se registran las concentraciones de CI. Hay que velar por que el analizador empleado esté equipado de forma adecuada para tratar las muestras alcalinas preparadas según este método.

56. El principio del presente método consiste en que, tras la adición de álcali y la agitación, se hace despreciable la concentración de CI en el espacio de cabeza. Es necesario demostrar al menos una vez que esto es así con el sistema de ensayo, utilizando patrones de CI, añadiendo álcali y dejando equilibrar, para medir a continuación la concentración de CI tanto en la fase del espacio de cabeza como en la líquida (véase el punto 53). La concentración en el espacio de cabeza debe aproximarse a cero. Esta comprobación de que la absorción de $CO_2$ es prácticamente total no resulta necesario hacerla cada vez que se realiza el ensayo.

57. Si se quiere medir la eliminación del COD (solo con sustancias problema hidrosolubles), hay que tomar muestras de la fase líquida de distintos frascos (a los que no se ha añadido álcali), filtrarlas por membrana e inyectarlas en el analizador de COD. Estos frascos pueden utilizarse en otros análisis en caso necesario, para medir la biodegradabilidad primaria.

▼M4

DATOS E INFORME

**Cálculo de los resultados**

58. Suponiendo una mineralización del 100 % de la sustancia problema en $CO_2$, el CITe que supere el producido en los controles en blanco equivale al COT añadido a cada frasco de ensayo al inicio del ensayo; es decir:

$$CITe = COT$$

La masa total (mg) del carbono inorgánico (CIT) de cada frasco es:

$$CIT = (\text{mg C en el líquido} + \text{mg C en el espacio de cabeza}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \qquad \text{Ecuación [1]}$$

donde:

$V_L$ = volumen de líquido en el frasco (litros);

$C_L$ = concentración de CI en el líquido (mg/l en carbono);

$V_H$ = volumen del espacio de cabeza (litros);

$C_H$ = concentración de CI en el espacio de cabeza (mg/l en carbono).

Los cálculos del CIT de los dos métodos analíticos utilizados para medir el CI en este ensayo se describen más adelante, en los puntos 60 y 61. El porcentaje de biodegradación (% D) en cada caso viene dado por la fórmula siguiente:

$$\%D = \frac{(CIT_t - CIT_b)}{COT} \times 100 \qquad \text{Ecuación [2]}$$

donde:

$CIT_t$ = mg CIT en el frasco de ensayo en el tiempo t;

$CIT_b$ = mg CIT medio en los frascos en blanco en el tiempo t;

COT = mg COT añadidos inicialmente al recipiente de ensayo.

El porcentaje de biodegradación (% D) se calcula para los frascos de ensayo ($F_T$), de referencia ($F_C$) y, cuando se incluyan, de control del seguimiento de la inhibición ($F_I$) a partir de las respectivas cantidades de CIT producidas hasta cada tiempo de muestreo.

59. Si se observa un aumento significativo del contenido de CIT de los controles estériles ($F_S$) a lo largo del período de ensayo, puede concluirse que ha habido degradación abiótica de la sustancia problema, y hay que tener esto en cuenta al calcular el valor de D en la ecuación [2].

**Acidificación a pH < 3**

60. Dado que la acidificación a pH < 3 y el equilibrado resulta en la igualación de la concentración de CIT en las fases líquida y gaseosa, solo debe medirse la concentración de CI en la fase gaseosa. Así pues, de la ecuación [1] se desprende que $CIT = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, donde $V_B$ = volumen del frasco de suero.

**Conversión del $CO_2$ en carbonato**

61. En este método se realizan los cálculos como en la ecuación [1], pero se ignora la cantidad despreciable de CI presente en la fase gaseosa, es decir, $V_H \times C_H = 0$, y $CIT = V_L \times C_L$.

▼M4

**Expresión de los resultados**

62. Se obtiene una curva de biodegradación representando el porcentaje de biodegradación, D, frente al tiempo de incubación y, si es posible, se indican las fases de latencia y de biodegradación y el período de observación de 10 días, así como la fase de meseta, es decir, la fase en que se ha alcanzado la degradación máxima y se ha aplanado la curva de biodegradación. Si se obtienen resultados comparables con los recipientes de ensayo paralelos $F_T$ (< 20 % de diferencia), se representa una curva media (véase el apéndice 2, fig.1); en caso contrario, se representan las curvas de cada recipiente. Se determina el valor medio del porcentaje de biodegradación en la fase de meseta o se evalúa el valor máximo (por ejemplo, cuando la curva decrece en la fase de meseta), pero es importante evaluar que en este último caso el valor no es anómalo. Hay que indicar este nivel máximo de biodegradación en el informe de ensayo como "grado de biodegradación de la sustancia problema". Si el número de recipientes de ensayo es insuficiente para indicar la fase de meseta, se utilizan los valores medidos el último día del ensayo para calcular el valor medio. Este último valor, la media de cinco réplicas, sirve para indicar la precisión con que se ha determinado el porcentaje de biodegradación. Indíquese también el valor obtenido al final del período de observación de 10 días.

63. De la misma manera, se representa la curva para la sustancia de referencia, $F_C$, y, si están incluidos, para la comprobación de la eliminación abiótica, $F_S$ y el control de la inhibición, $F_I$.

64. Se registran las cantidades de CIT presentes en los controles en blanco ($F_B$), así como las de los frascos $F_S$ (comprobación abiótica), si se han incuido en el ensayo los recipientes correspondientes.

65. Calcular el valor de D correspondiente a los recipientes $F_I$, sobre la base del rendimiento de CI teórico previsto a partir de únicamente el componente de referencia de la mezcla. Si, al día 28, $[(D_{FC}\ (^1) - D_{FI}\ (^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, puede aceptarse que la sustancia problema ha inhibido la actividad del inóculo, y esto puede explicar la obtención de bajos valores de $D_{FT}$ en las condiciones del ensayo. En este caso, el ensayo puede repetirse utilizando una concentración de ensayo menor y, de preferencia, reduciendo el CID en el inóculo y el CIT formado en los controles en blanco, ya que, si no, la menor concentración reduciría la precisión del método. También puede utilizarse otro inóculo. Si en el frasco $F_S$ (abiótico) se observa un aumento significativo (> 10 %) en la cantidad de CIT, es posible que se hayan dado procesos de degradación abiótica.

**Validez de los resultados**

▼M7

66. Se considera que un ensayo es válido si:

a) el valor medio del porcentaje de degradación en los recipientes $F_C$ que contienen la sustancia de referencia es > 60 % para el 14º día de incubación; y

b) el valor medio del CIT presente en los testigos en blanco $F_B$ al final del ensayo es < 3 mg C/l.

Si no se respetan estos límites, hay que repetir el ensayo con un inóculo procedente de otra fuente o revisar los procedimientos aplicados. Por ejemplo, si la obtención de un contenido elevado de CI en los blancos es un problema, debe seguirse el procedimiento contemplado en los puntos 27 a 32.

(1) Porcentaje de degradación en los recipientes $F_C$ que contienen la sustancia de referencia.
(2) Porcentaje de degradación en los recipientes $F_I$.

▼M4

67. Si la sustancia problema no alcanza el 60 % del CITe y se ha visto que no es inhibidora (punto 65), podría repetirse el ensayo con una concentración superior del inóculo (hasta 30 mg/l de lodo activado y 100 ml de efluente/l) o inóculo de otras fuentes, sobre todo si la degradación estaba en la banda del 20 al 60 %.

**Interpretación de los resultados**

68. Una biodegradación > 60 % del CITe en el plazo de observación de 10 días en este ensayo demuestra que la sustancia problema es fácilmente biodegradable en condiciones aerobias.

69. Si no se alcanza el umbral del 60 % del CITe, determinar el valor de pH en los medios de los frascos que no se han acidificado ni alcalinizado; un valor inferior a 6,5 podría indicar que se ha producido nitrificación. En tal caso, repítase el ensayo con una solución amortiguadora de mayor concentración.

**Informe del ensayo**

70. Elaborar una tabla con los valores del % D de cada uno de los frascos de ensayo ($F_T$), de referencia ($F_C$) y, si se han incluido, de control de la inhibición ($F_I$) correspondientes a cada día muestreado. Si se obtienen resultados comparables con los frascos replicados, trazar la curva del valor medio del % D frente al tiempo. Registrar la cantidad de CIT en los blancos ($F_B$) y en los controles estériles ($F_S$), así como el COD y otros parámetros, y su porcentaje de eliminación.

71. Determinar el valor medio del % D en la fase de meseta, o utilizar el valor máximo si la curva de biodegradación decrece en la fase de meseta, y comunicarlo como "grado de biodegradación de la sustancia problema". Es importante asegurarse de que en este último caso el valor máximo no es anómalo.

72. El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural, y propiedades fisicoquímicas pertinentes.

— Pureza (impurezas) de la sustancia problema.

*Condiciones de ensayo:*

— Referencia al presente método de ensayo.

— Descripción del sistema de ensayo utilizado (por ejemplo, volumen del recipiente, relación entre el volumen del espacio de cabeza y el del líquido, método de agitación, etc.).

— Aplicación de la sustancia problema y de la sustancia de referencia al sistema de ensayo: concentración de ensayo utilizada y cantidad de carbono añadida a cada frasco de ensayo, eventual uso de disolventes.

— Datos del inóculo empleado, eventual tratamiento y acondicionamiento previos.

— Temperatura de incubación.

— Validación del principio del análisis del CI.

— Características principales del analizador de IC empleado (y de otros eventuales métodos analíticos aplicados).

— Número de réplicas.

*Resultados:*

— Datos en bruto y valores calculados de biodegradabilidad en forma tabular.

▼M4

— Gráficas del porcentaje de degradación frente al tiempo correspondientes a la sustancia problema y a la sustancia de referencia, fase de latencia, fase de degradación, período de observación de 10 días y pendiente.

— Porcentaje de eliminación en la meseta, al final del ensayo y tras el período de observación de 10 días.

— Motivos del eventual rechazo de los resultados del ensayo.

— Cualquier otro dato que pueda ser pertinente sobre el procedimiento seguido.

— Discusión de los resultados.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Capítulo C.4 del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad "fácil". Ensayo de desprendimiento de $CO_2$ (método C.4-C)

(2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159-167.

(3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153-1161.

(4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195-1210.

(5) ISO 9439 (1990; revisada en 1999). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método por valoración del dióxido de carbono producido (Sturm).

(6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

(8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922-929.

(9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801-812.

(10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181-185.

(11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51-53.

(12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233-243.

(13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204-211.

(14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507-524.

(15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527-1550.

▼**M4**

(16) ISO 14593 (1999). Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad aerobia final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método de análisis del carbono inorgánico en recipientes cerrados (ensayo del $CO_2$ en el espacio de cabeza).

(17) Battersby NS (1997). The ISO headspace C02 biodegradation test, Chemosphere 34: 1813-1822.

(18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

(19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An "inherent" biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219-3235.

(20) Capítulo C.4 del presente anexo: Determinación de la biodegradabilidad "fácil".

(21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman's report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.

(22) Capítulo C.11 del presente anexo. Lodo activado: Prueba de inhibición de la respiración.

(23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319-327.

(24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace $CO_2$ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.

(25) ISO 10634 (1996) Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.

▼M4

*Apéndice 1*

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

**CI:** Carbono inorgánico.

**$CO_2$Te:** Dióxido de carbono teórico (mg); es la cantidad de dióxido de carbono que se calcula que va a producirse a partir del contenido en carbono, conocido o medido, de la sustancia problema cuando se mineraliza completamente; se expresa también como mg de dióxido de carbono producido por mg de sustancia problema.

**COD:** Carbono orgánico disuelto; es el carbono orgánico presente en solución o el que pasa a través de un filtro de 0,45 micrómetros o permanece en el sobrenadante tras centrifugación a aproximadamente 4 000 g (± 40 000 m $sec^{-2}$) durante 15 minutos.

**CID:** Carbono inorgánico disuelto.

**CITe:** Carbono inorgánico teórico.

**CIT:** Carbono inorgánico total.

**Fácilmente biodegradable:** Categoría arbitraria de sustancias químicas que han pasado determinados ensayos exploratorios específicos en cuanto a la biodegradabilidad última; estos ensayos son tan estrictos que se acepta que estos compuestos se degradan rápida y completamente en los medios ambientes acuáticos en condiciones aerobias.

**Período de observación de 10 días:** Son los 10 días que siguen inmediatamente al momento en que se alcanza el 10 % de degradación.

**Biodegradabilidad intrínseca:** Categoría de sustancias químicas que presentan signos inequívocos de biodegradación (primaria o final) en algún ensayo de biodegradabilidad.

**Biodegradación aerobia final:** Es el nivel de degradación al que llega la sustancia problema cuando es totalmente utilizada por microorganismos dando lugar a la producción de dióxido de carbono, agua, sales minerales y nuevos constituyentes celulares microbianos (biomasa).

**Mineralización:** Degradación completa de una sustancia orgánica a $CO_2$ y $H_2O$ en condiciones aerobias y a $CH_4$, $CO_2$ y $H_2O$ en condiciones anaerobias.

**Fase de latencia:** Tiempo comprendido desde el inicio de un ensayo hasta que se consigue la aclimatación o adaptación de los microorganismos de degradación y llega a un nivel detectable el grado de biodegradación de una sustancia o materia orgánica problema (por ejemplo, hasta el 10 % de la biodegradación teórica máxima, o menos, en función de la exactitud de la técnica de medición).

**Fase de degradación:** Tiempo transcurrido desde el final de la fase de latencia hasta el momento en que se alcanza el 90 % del nivel máximo de degradación.

**Fase de meseta:** Fase en la que se ha alcanzado la degradación máxima y se ha aplanado la curva de biodegradación.

**Sustancia problema:** Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

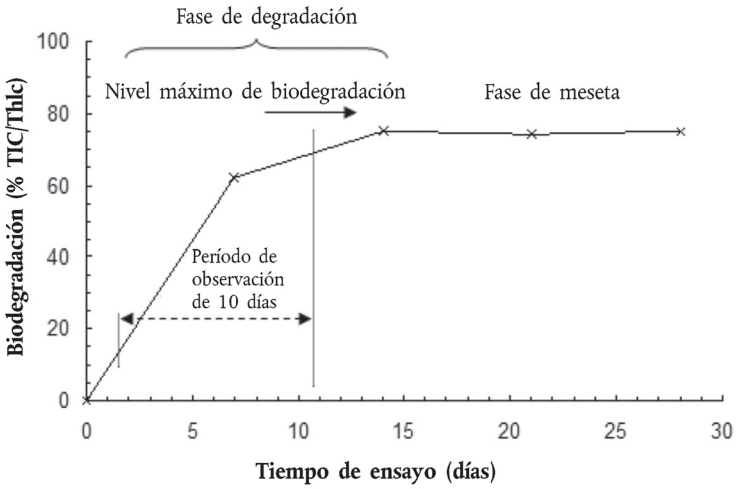
▼M4

*Apéndice 2*

**Ejemplo de curva de biodegradación**

***Figura 1***

**Biodegradación del 1-octanol en el ensayo del espacio de cabeza de $CO_2$**




*Glosario:*

Biodegradación

Fase de degradación

Nivel máximo de biodegradación

Fase de meseta

Período de observación de 10 días

Tiempo de ensayo (días)

▼M4

## C.30. BIOACUMULACIÓN EN OLIGOQUETOS TERRESTRES

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo de la OCDE TG 317 (2010). Entre los métodos de ensayo relativos al destino en el medio ambiente, los denominados Bioconcentración — Ensayo dinámico con peces [capítulo C.13 del presente anexo (49)] y Bioacumulación en oligoquetos bentónicos que viven en los sedimentos (53) se publicaron respectivamente en 1996 y 2008, respectivamente. Extrapolar datos de bioacumulación acuática a los organismos terrestres, como los gusanos de tierra, resulta difícil, si no imposible. Actualmente se utilizan modelos de cálculo basados en la lipofilia de la sustancia problema [por ejemplo, (14) (37)] para la evaluación de la bioacumulación de sustancias en el suelo como, por ejemplo, en el documento de orientación técnica de la UE (19). Ya se ha establecido la necesidad de disponer de un método específico del compartimento [por ejemplo, (55)]. Esto es especialmente importante para la evaluación del envenenamiento secundario en cadenas alimentarias terrestres (4). Varios métodos de ensayo nacionales se refieren a la cuestión de la bioacumulación en organismos diferentes de los peces, como, por ejemplo, (2) y (72). La American Society for Testing and Materials ha elaborado un método para medir la bioacumulación en gusanos de tierra (*Eisenia fetida,* Savigny) y gusanos terrestres del género *Enchytraeus* (3). Un método reconocido internacionalmente para la determinación de la bioacumulación en suelo enriquecido mejorará la evaluación del riesgo que plantean las sustancias para los ecosistemas terrestres [por ejemplo, (25) (29)].

2. Los invertebrados que ingieren suelo están expuestos a las sustancias unidas a este. Entre dichos animales, los oligoquetos terrestres desempeñan una papel importante para la estructura y la función de los suelos (15) (20). Los oligoquetos terrestres viven en el interior del suelo y parcialmente en su superficie (especialmente en la capa de materia orgánica en descomposición); suelen representar las especies más abundantes en términos de biomasa (54). Al remover la tierra y servir de presa estos animales pueden influir mucho en la biodisponibilidad de las sustancias para otros organismos, como predadores invertebrados [por ejemplo, ácaros y escarabajos predadores (64)] o vertebrados [por ejemplo, zorros y gaviotas (18) (62)]. En el apéndice 5 se describen algunas especies de oligoquetos terrestres que se utilizan actualmente en ensayos ecotoxicológicos.

3. La guía ASTM Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus* (3) proporciona muchos datos fundamentales y útiles para la realización del presente método de ensayo sobre bioacumulación en el suelo. También se hace referencia en el presente método de ensayo al capítulo C.13 del presente anexo (Bioconcentración — Ensayo dinámico con peces) (49) y a las directrices TG 315 de la OCDE (Bioacumulación en oligoquetos bentónicos que viven en los sedimentos) (53). Asimismo, constituyen fuentes principales de información para el presente método de ensayo la experiencia práctica con estudios de bioacumulación en el suelo y las publicaciones de la bibliografía, como, por ejemplo, (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. El método de ensayo es sobre todo aplicable a las sustancias orgánicas neutras y estables, que tienden a adsorberse al suelo. Es posible que este método de ensayo pueda aplicarse en los ensayos de bioacumulación de compuestos organometálicos estables que se asocian al suelo. También es aplicable a los metales y otros oligoelementos.

REQUISITO PREVIO

5. Se han realizado ensayos para medir la bioacumulación en los oligoquetos terrestres en relación con metales pesados [véase por ejemplo (63)] y de sustancias orgánicas persistentes con un valor de log $K_{ow}$ entre 3,0 y 6,0 [véase por ejemplo (40)]. Estos ensayos también son aplicables a:

— las sustancias con un valor de log $K_{ow}$ superior a 6,0 (sustancias superhidrofóbicas),

▼M4

— las sustancias que pertenecen a una clase de sustancias orgánicas de las que se sepa que tienen potencial para bioacumularse en organismos vivos como, por ejemplo, las sustancias tensioactivas o muy adsorbentes,

— las sustancias cuyas características estructurales indican potencial de bioacumulación como, por ejemplo, los análogos de sustancias con potencial de bioacumulación conocido, y

— los metales.

6. Antes de empezar el estudio ha de obtenerse información sobre la sustancia problema, como el nombre común, el nombre químico (de preferencia la denominación IUPAC), la fórmula estructural, el número de registro CAS, la pureza, las precauciones de seguridad, las condiciones adecuadas de conservación y los métodos analíticos. Además, deben conocerse los datos siguientes:

a) hidrosolubilidad;

b) coeficiente de reparto octanol/agua $K_{ow}$;

c) coeficiente de reparto suelo/agua $K_{oc}$;

d) presión de vapor;

e) degradabilidad (por ejemplo, en el suelo, en agua);

f) metabolitos conocidos.

7. Pueden utilizarse sustancias problema tanto con marcado radiactivo como sin él. Sin embargo, para facilitar el análisis se recomienda emplear sustancias problema con marcado radiactivo. La decisión dependerá de los límites de detección o de la necesidad de medir la sustancia problema inicial y sus metabolitos Si se utiliza una sustancia problema con marcado radiactivo y se miden los residuos radiactivos totales, es importante caracterizar estos residuos tanto en el suelo como en los organismos de ensayo en cuanto a los porcentajes de sustancia problema inicial y de otras sustancias marcadas, por ejemplo en muestras tomadas en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción, para poder calcular un factor de bioacumulación (BAF) de la sustancia problema inicial y de sus metabolitos importantes presentes en el suelo (véase el punto 50). Es posible que se tenga que modificar el método aquí descrito como, por ejemplo, para conseguir biomasa suficiente o para medir sustancias problema orgánicas no marcadas radiactivamente o metales. Cuando se miden los residuos radiactivos totales (por recuento de centelleo líquido tras la extracción, combustión o disolución de los tejidos), el factor de bioacumulación se basará en la sustancia problema inicial y en sus metabolitos. El cálculo del BAF se basará preferentemente en la concentración de la sustancia problema inicial en los organismos y en los residuos radiactivos totales. Posteriormente, debe calcularse el factor de acumulación biota-suelo (BSAF), normalizado teniendo en cuenta el contenido de lípidos de los gusanos y el contenido de carbono orgánico (CO) del suelo, a partir del BAF, para permitir comparar los resultados obtenidos con diferentes ensayos de bioacumulación.

8. Debe conocerse la toxicidad de la sustancia problema para la especie utilizada en el ensayo, por ejemplo en forma de concentración con efecto (ECx) o de concentración letal (LCx) por la fase de absorción [por ejemplo, (19)]. Normalmente, la concentración seleccionada de la sustancia problema será aproximadamente del 1 % de su $LC_{50}$ aguda asintótica, y al menos diez veces superior a su límite de detección en el suelo por el método de análisis elegido. Cuando sea posible, se dará prioridad a los valores de toxicidad derivados de estudios a largo plazo con parámetros subletales (51) (52). Si no se dispone de tales datos, un ensayo de toxicidad aguda aportará información útil [véase, por ejemplo, (23)].

▼M4

9. Debe disponerse de un método analítico adecuado, de exactitud, precisión y sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia en las soluciones de ensayo, en el suelo y en el material biológico, así como de datos sobre la preparación y la conservación de las muestras, junto con las fichas de datos de seguridad de los materiales. Es necesario también conocer el límite de detección analítica de la sustancia problema tanto en el suelo como en los tejidos de los gusanos. Si se utiliza una sustancia problema con marcado radiactivo, debe conocerse la radiactividad específica (es decir, en Bq $mol^{-1}$) y el porcentaje de radiactividad asociada con las impurezas. La radiactividad específica de la sustancia problema debe ser suficentemente elevada para facilitar el análisis, y las concentraciones de ensayo utilizadas no deben provocar efectos tóxicos.

10. El ensayo puede efectuarse con suelo artificial o con suelos naturales. Antes del inicio del ensayo debe disponerse de información sobre las características del suelo natural empleado como, por ejemplo, origen del suelo o sus componentes, pH, contenido de carbono orgánico, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), y capacidad de retención de agua (WHC) (3) (48).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. Entre los parámetros que caracterizan la bioacumulación de una sustancia problema se cuentan el factor de bioacumulación (BAF), la constante de la velocidad de absorción ($k_s$) y la constante de la velocidad de eliminación ($k_e$). En el apéndice 1 se dan las definiciones pertinentes.

12. El ensayo se divide en dos fases: la de absorción (exposición) y la de eliminación (post-exposición). Durante la fase de absorción, se exponen al suelo, que se ha enriquecido con la sustancia problema, grupos de gusanos en paralelo (réplicas). Además de los animales de ensayo, se someten a las mismas condiciones pero sin la sustancia problema grupos de gusanos de control. Se miden el peso seco y el contenido de lípidos de los organismos de ensayo. Esto puede hacerse con gusanos del grupo de control. Pueden obtenerse valores analíticos de referencia (blanco) analizando muestras del suelo y de los gusanos de control. Para la fase de eliminación, los gusanos se pasan a un suelo libre de la sustancia problema. Siempre hay que hacer una fase de eliminación, salvo que la absorción de la sustancia problema durante la fase de exposición haya sido insignificante. La fase de eliminación aporta información sobre la velocidad a la que los organismos de ensayo excretan la sustancia problema [por ejemplo, (27)]. Si durante la fase de absorción no se ha llegado a un estado de equilibrio, es preferible que la determinación de los parámetros cinéticos (factor de bioacumulación cinético, BAFk) y las constantes de velocidad de absorción y de eliminación se base en el ajuste simultáneo de los resultados de las fases de absorción y de eliminación. La concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de los gusanos es objeto de seguimiento a lo largo de ambas fases del ensayo.

13. Durante la fase de absorción, se efectúan mediciones a los tiempos de muestreo hasta 14 días (enquitreidos) o 21 días (gusanos de tierra) hasta que se alcance el estado de equilibrio (11) (12) (67). El estado de equilibrio se alcanza cuando una representación de la concentración en los gusanos frente al tiempo es paralela al eje del tiempo, y tres análisis sucesivos de la concentración efectuados con muestras tomadas a intervalos de al menos dos días no muestran una diferencias entre sí superiores al ± 20 % sobre la base de comparaciones estadísticas (por ejemplo, análisis de varianza, análisis de regresión).

14. La fase de eliminación consiste en transferir los organismos de ensayo a recipientes que contienen el mismo sustrato pero sin la sustancia problema. Durante la fase de eliminación, se llevan a cabo mediciones a los tiempos de muestreo durante 14 días (enquitreidos) o 21 días (gusanos de tierra) salvo que en alguna determinación analítica se ponga antes de manifiesto que se ha llegado a una reducción del 90 % de los residuos de la sustancia problema en los gusanos. La concentración de la sustancia problema en los gusanos al final de la fase de eliminación se registra como residuos no eliminados. El

▼M4

factor de bioacumulación en el estado de equilibrio (BAFss) se calcula de preferencia como la proporción de la concentración en gusanos (Ca) y en el suelo (Cs) en el estado de equilibrio aparente, y también como factor de bioacumulación cinético (BAFk) que es la proporción entre la constante de la velocidad de absorción desde el suelo ($k_s$) y la constante de la velocidad de eliminación ($k_e$) (véanse las definiciones en el apéndice 1), aceptando que la cinética es de orden 1 (véanse los cálculos en el apéndice 2). En caso de que claramente no pueda aplicarse la cinética de primer orden, será necesario emplear otros modelos.

15. La constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de eliminación (o constantes, cuando participen otros modelos), el factor de bioacumulación cinético (BAFk) y, cuando sea posible, los límites de confianza de cada uno de estos parámetros, se calculan a partir de ecuaciones modelo con ayuda de ordenador (véanse orientaciones en el apéndice 2). La adecuación del ajuste de cualquier modelo puede determinarse a partir de, por ejemplo, el coeficiente de correlación o del coeficiente de determinación (si los coeficientes están próximos a la unidad, es que la adecuación es buena) o con la prueba de ji cuadrado. También puede ser indicativo de la calidad del ajuste del modelo el orden del error típico o el límite de confianza alrededor de los parámetros estimados.

16. Para reducir la variabilidad de los resultados de los ensayos de sustancias problema con elevada lipofilia, los factores de bioacumulación deben expresarse en relación con el contenido de lípidos y el contenido de carbono orgánico (kg de carbono orgánico en el suelo/kg de contenido de lípidos en los gusanos). Este enfoque se basa en el hecho de que, con algunos tipos de sustancias químicas, hay una clara relación entre el potencial de bioacumulación y la lipofilia; esto está bien demostrado en peces (47). Hay una relación entre el contenido en lípidos de los peces y la bioacumulación de tales sustancias. Se han encontrado correlaciones similares en los organismos bentónicos [véanse, por ejemplo, (30) (44)]. Análogamente se ha demostrado esta correlación en el caso de los oligoquetos terrestres [véanse por ejemplo (5) (6) (7) (14)]. Si se dispone de suficiente tejido de gusanos, puede determinarse el contenido en lípidos de los animales de ensayo con el mismo material biológico que se utilice para determinar la concentración de la sustancia problema. Otra posibilidad es utilizar los animales de control para medir el contenido en lípidos.

VALIDEZ DEL ENSAYO

17. Para que un ensayo sea válido, deben cumplir los siguientes criterios tanto los grupos de control como los de tratamiento:

— Al final del ensayo, la mortalidad general durante las fases de absorción y de eliminación no debe superar el 10 % (gusanos de tierra) o el 20 % (enquitreidos) del número total de gusanos introducidos.

— Respecto a *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*, la pérdida media de masa medida al final de la fase de absorción y al final de la fase de eliminación no debe superar el 20 % respecto al peso fresco (pf) al inicio de cada fase.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Especies de ensayo**

18. Para el ensayo de bioacumulación se recomienda emplear varias especies de oligoquetos terrestres. Las especies *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei* (Lumbricidae), o *Enchytraeus albidus, Enchytraeus crypticus,* o *Enchytraeus luxuriosus* (Enchytraeidae), que son las más frecuentemente utilizadas, se describen en el apéndice 5.

▼M4

**Equipo**

19. Se tendrá cuidado de no utilizar, con ninguna parte del equipo, materiales que puedan disolver o adsorber la sustancia problema o lixiviar otras sustancias, o tener algún efecto adverso sobre los animales de ensayo. Pueden utilizarse recipientes normales rectangulares o cilíndricos, de materiales químicamente inertes y de una capacidad adecuada para la tasa de carga, es decir, para el número de gusanos de ensayo. Para los equipos que estén en contacto con los medios de ensayo pueden utilizarse acero inoxidable, plástico o vidrio. Los recipientes de ensayo deben estar cubiertos de forma adecuada para evitar que se escapen los gusanos, pero permitiendo que entre suficiente aire. En el caso de sustancias con elevados coeficientes de adsorción, como los piretroides sintéticos, puede ser necesario emplear vidrio silanizado. Será necesario, en estos casos, deshacerse de los equipos una vez usados (49). Debe evitarse que se escapen las sustancias problema con marcado radiactivo y también las sustancias volátiles. Deben emplearse trampas (por ejemplo, frascos lavadores de gas, de vidrio) con absorbentes adecuados para retener los eventuales residuos que se evaporen de los recipientes de ensayo.

**Suelo**

20. El suelo de ensayo debe ser tal que permita la supervivencia y, preferentemente, la reproducción de los organismos de ensayo durante los períodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan comportamientos ni aspectos anormales en los animales. Los gusanos deben enterrarse en el suelo.

21. Se recomienda para usarlo como sustrato de los ensayos el suelo artificial descrito en el capítulo C.8 del presente anexo (48). En el apéndice 4 se explica la preparación del suelo artificial para emplearlo en los ensayos de acumulación, y se dan recomendaciones para su almacenamiento. El suelo artificial secado al aire puede conservarse a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

22. Sin embargo, como suelo para el ensayo o para el cultivo de los gusanos pueden emplearse suelos naturales procedentes de lugares exentos de contaminación. Los suelos naturales deben caracterizarse al menos por su origen (lugar de recogida), pH, contenido de carbono orgánico, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), capacidad de retención de agua máxima del suelo (WHCmax), y contenido porcentual de agua (3). El análisis del suelo o de sus componentes para detectar microcontaminantes antes de la utilización debe aportar información útil. Si se utiliza suelo de campo de tierras agrícolas, no debe haberse tratado con productos fitosanitarios ni haberse fertilizado con estiércol de animales tratados durante al menos un año ni con fertilizantes orgánicos durante al menos seis meses antes del muestreo (50). En la referencia 3 se describen los procedimientos de manipulación de los suelos naturales antes de su empleo en los ensayo de ecotoxicología con oligoquetos en laboratorio. El período de almacenamiento de los suelos naturales en el laboratorio debe ser lo más breve posible.

**Aplicación de la sustancia problema**

23. La sustancia problema se incorpora al suelo. Hay que tener en cuenta las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema. Las sustancias problema hidrosolubles deben disolverse completamente en agua antes de mezclarse con el suelo. El procedimiento de enriquecimiento del suelo con sustancias problema poco hidrosolubles implica el recubrimiento de uno o varios de los componentes del suelo (artificial) con la sustancia problema. Por ejemplo, la arena de cuarzo, o una porción de la misma, puede sumergirse en una solución de la sustancia problema en un disolvente orgánico adecuado, que se evapora lentamente después hasta sequedad. La fracción recubierta puede mezclarse a continuación con el suelo húmedo. La ventaja principal de este procedimiento es que no se introduce ningún disolvente en

▼M4

el suelo. Cuando se utiliza suelo natural, la sustancia problema puede añadirse introduciéndola en una porción de suelo secada al aire como se describe más arriba respecto al suelo artificial, o agitando la sustancia problema en el suelo húmedo, con una fase posterior de evaporación si se utiliza agente solubilizante. En general, debe evitarse el contacto del suelo húmedo con los disolventes, en la medida de lo posible. Deben considerarse los elementos siguientes (3):

— Si se utiliza un disolvente distinto del agua, debe ser uno miscible con esta y/o que pueda extraerse (por ejemplo, mediante evaporación), para dejar en el suelo solamente la sustancia problema.

— Si se utiliza un control del disolvente, no es necesario emplear un control negativo. El control del disolvente debe contener la máxima concentración de disolvente que se haya añadido al suelo y hay que utilizar disolvente del mismo lote empleado para hacer la solución madre. Los principales criterios para la selección de un agente solubilizante adecuado deben ser la toxicidad y la volatilidad del disolvente, y la solubilidad de la sustancia problema en el disolvente elegido.

24. En el caso de sustancias poco solubles en agua y en disolventes orgánicos, es posible mezclar (por ejemplo, utilizando un mortero) entre 2,0 y 2,5 g de arena de cuarzo finamente molida por recipiente de ensayo con la cantidad de sustancia problema necesaria para obtener la concentración de ensayo deseada. Esta mezcla de arena de cuarzo y sustancia problema se añade al suelo previamente humedecido y se mezcla completamente con la cantidad adecuada de agua desionizada para obtener el contenido necesario de humedad. La mezcla final se reparte en los recipientes de ensayo. Se repite el procedimiento con cada concentración de ensayo, y se prepara asimismo un control adecuado con 2,0 – 2,5 g de arena de cuarzo finamente molida por recipiente de ensayo.

25. Debe determinarse la concentración de la sustancia problema en el suelo tras su adición a este. Ha de verificarse que la sustancia problema está distribuida de forma homogénea en el suelo antes de introducir los organismos de ensayo. Hay que indicar el método utilizado para añadir la sustancia problema y los motivos de la elección del procedimiento concreto (24).

26. Lo ideal es que se establezca el equilibrio entre el suelo y la fase de agua intersticial antes de añadir los organismos; se recomienda dejar un tiempo de cuatro días a 20 °C. Con muchas sustancias orgánicas poco hidrosolubles, el plazo necesario para alcanzar un equilibrio verdadero entre las fracciones adsorbidas y las disueltas puede ser del orden de días o de meses. En función del objeto del estudio, por ejemplo cuando se pretende simular las condiciones ambientales, el suelo al que se ha añadido la sustancia puede "envejecerse" durante un plazo mayor como por ejemplo, en el caso de los metales, de tres semanas a 20 °C (22).

**Cultivo de los organismos de ensayo**

27. Es preferible mantener los gusanos en cultivos de laboratorio permanentes. En el apéndice 5 se dan orientaciones sobre los métodos de cultivo en laboratorio de *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei,* así como de especies de enquitreidos [véanse también (48) (51) (52)].

28. Los gusanos utilizados en los ensayos deben estar libres de enfermedades, anomalías y parásitos observables.

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

29. Los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema durante la fase de absorción, la cual debe durar 14 días (con los enquitreidos) o 21 días (con los gusanos de tierra), salvo que se demuestre que se ha alcanzado el estado de equilibrio.

▼M4

30. Para la fase de eliminación, los gusanos se pasan a un suelo libre de la sustancia problema. La primera muestra debe tomarse a las 4 – 24 h tras el inicio de la fase de eliminación. En el apéndice 3 se dan ejemplos de planes de muestreo con una fase de absorción de 21 días y una fase de eliminación también de 21 días.

**Organismos de ensayo**

31. En muchas especies de enquitreidos terrestres, el peso de cada individuo es muy bajo (por ejemplo, de 5-10 mg de peso húmedo por individuo de *Enchytraeus albidus* y aún menos en el caso de *Enchytraeus crypticus* o de *Enchytraeus luxuriosus*); a fin de efectuar las mediciones del peso y el análisis químico, puede ser necesario agrupar los gusanos de los recipientes de ensayo replicados (es decir, todos los gusanos de un recipiente replicado se utilizarán para obtener un solo resultado de los tejidos analizados). A cada recipiente replicado se añaden 20 individuos de enquitreidos, y se utilizan al menos tres réplicas. Si el límite de detección analítica de la sustancia problema es elevado, puede ser necesario emplear más gusanos. Cuando se trate de especies de ensayo con mayor peso individual (*Eisenia fetida* y *Eisenia andrei*), pueden emplearse recipientes replicados con un solo individuo.

32. Los gusanos de tierra empleados en un ensayo deben tener pesos similares (por ejemplo, los individuos de *Eisenia fetida* y de *Eisenia andrei* deben tener un peso de 250 – 600 mg). Los enquitreidos (por ejemplo, *Enchytraeus albidus*) deben tener una longitud aproximada de 1 cm. Todos los gusanos utilizados en un ensayo concreto deben proceder de la misma fuente, y ser adultos con clitelo (véase el apéndice 5). Ya que el peso y la edad de un animal pueden afectar a los valores del BAF (por ejemplo, debido a las variaciones en el contenido de lípidos o a la presencia de huevos), estos parámetros deben registrarse con exactitud y tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados. Además, pueden depositarse capullos durante el período de exposición, lo que también afecta a los valores del BAF. Se recomienda pesar una submuestra de la población de gusanos de ensayo antes del ensayo, para calcular el peso medio, tanto seco como húmedo.

33. Debe ser elevada la proporción de suelo respecto a los gusanos, para minimizar la disminución de la concentración de la sustancia problema en el suelo durante la fase de absorción. Con *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* se recomienda una cantidad mínima de 50 g de peso seco (p.s.) de suelo por gusano; con enquitreidos, la recomendación es de un mínimo de 10-20 g p.s. de suelo por recipiente de ensayo. Los recipientes deben contener una capa de suelo de 2-3 cm (enquitreidos) o 4-5 cm (gusanos de tierra).

34. Los gusanos empleados en un ensayo se toman del cultivo (por ejemplo, en el caso de los entriqueidos utilizando unas pinzas de joyero). Se transfieren animales adultos a un suelo de ensayo no tratado para su aclimatación, y se les da comida (véase el punto 36). Si las condiciones de ensayo son diferentes de las condiciones de cultivo, debe ser suficiente una fase de aclimatación de 24 – 72 h para que los gusanos se adapten a las condiciones de ensayo. Tras su aclimatación, los gusanos de tierra se lavan transfiriéndolos a placas de vidrio (por ejemplo, placas Petri) que contengan agua limpia, y después se pesan antes de añadirlos al suelo de ensayo. Antes de hacer la pesada, debe retirarse el exceso de agua de los gusanos, poniéndolos suavemente contra el borde de la placa o secándolos con precaución con una servilleta de papel humedecida ligeramente.

35. Debe observarse y registrarse la conducta de enterramiento de los organismos de ensayo. En los ensayos con gusanos de tierra, los animales (de control y de tratamiento) se entierran normalmente en el suelo en el plazo de unas pocas horas; ha de comprobarse que esto es así en el plazo máximo de 24 h tras la adición de los gusanos a los recipientes de ensayo. Si los gusanos no se entierran en el suelo (por ejemplo, hay más del 10 % de gusanos que no se entierran a lo largo de más de la mitad de la fase de absorción), puede ser que las condiciones de ensayo no sean adecuadas o bien que los organismos de ensayo no estén sanos. En tal caso, es necesario parar el ensayo y repetirlo. Los enquitreidos viven principalmente en los

▼M4

poros intersticiales del suelo, y con frecuencia su tegumento puede estar en contacto tan solo parcial con el sustrato que lo rodea; se acepta que la exposición de los enquitreidos enterrados y no enterrados es equivalente, y el que estos animales no se entierren no implica necesariamente que deba repetirse el ensayo.

**Alimentación**

36. Debe preverse dar alimento a los animales cuando se utilice un suelo con bajo contenido de carbono orgánico total. Si se utiliza suelo artificial, se recomienda una tasa de alimentación semanal (es decir, los gusanos se alimentan una vez por semana) de 7 mg de estiércol seco por gramo de suelo en peso seco para los gusanos de tierra, y una tasa semanal de 2 – 2,5 mg de copos de avena molidos por gramo de suelo en peso seco para los enquitreidos (11). La primera ración de alimento debe mezclarse con el suelo justo antes de que se añadan los organismos de ensayo. Es preferible utilizar el mismo de tipo de alimento que en los cultivos (véase el apéndice 5).

**Luz y temperatura**

37. Los ensayos deben efectuarse con un ciclo controlado de 16/8 horas de luz/oscuridad, con un nivel de iluminación preferentemente de 400 a 800 lx en la zona de los recipientes de ensayo (3). La temperatura de ensayo debe ser de 20 ± 2 °C en toda la duración.

**Concentraciones de ensayo**

38. Se utiliza una única concentración. Deben justificarse las situaciones en que sea necesario añadir una o varias concentraciones más. Si la toxicidad ($EC_x$) de la sustancia problema está próxima al límite de detección analítica, se recomienda utilizar sustancias problema con marcado radiactivo de elevada radiactividad específica. En el caso de los metales, la concentración debe ser superior al nivel de fondo de los tejidos y del suelo.

**Réplicas**

39. Para las mediciones cinéticas (fases de absorción y de eliminación), el número mínimo de réplicas de recipientes tratados debe ser de tres por punto de muestreo. El número total de réplicas preparadas debe ser suficiente para todos los puntos de muestreo previstos de las fases de absorción y de eliminación.

40. Para las observaciones y mediciones biológicas (por ejemplo, relación entre peso seco y peso húmedo, contenido de lípidos) y para el análisis de las concentraciones de fondo en los gusanos y el suelo, deben preverse al menos 12 recipientes replicados de un control negativo (cuatro muestreados al inicio, cuatro al final de la fase de absorción y cuatro al final de la fase de eliminación) si no se utiliza ningún disolvente distinto del agua. Si se emplea algún agente solubilizante para la aplicación de la sustancia problema, debe utilizarse, además de las réplicas tratadas, un control del disolvente (cuatro recipientes de ensayo muestreados al inicio, cuatro al final de la fase de absorción y cuatro al final de la fase de eliminación) con todos los componentes salvo la sustancia problema. En este caso, pueden prepararse otros cuatro recipientes adicionales de un control negativo (sin disolvente) para permitir un muestreo opcional al final de la fase de absorción. Estas réplicas pueden compararse biológicamente con el control de disolvente para obtener información en cuanto a la posible influencia del disolvente sobre los organismos de ensayo. Se recomienda preparar un número suficiente de recipientes adicionales de reserva (por ejemplo, ocho) añadidos a los de tratamiento y de control.

▼M4

**Frecuencia de las mediciones de la calidad del suelo**

41. Al inicio y al final de las fases de absorción y de eliminación deben medirse el pH del suelo, el contenido de humedad del suelo y (continuamente) la temperatura de la sala del ensayo. Una vez por semana debe controlarse el contenido de humedad del suelo pesando los recipientes de ensayo y comparando los pesos medidos en cada momento con los pesos iniciales del comienzo del ensayo. Las pérdidas de agua deben compensarse añadiendo agua desionizada.

**Muestreo y análisis de los gusanos y del suelo**

42. En el apéndice 3 se encuentra un ejemplo de plan para las fases de absorción y de eliminación de los ensayos de bioacumulación en gusanos de tierra y en enquitreidos.

43. Se toman muestras del suelo de los recipientes de ensayo para la determinación de la concentración de la sustancia problema antes de introducir los gusanos, y durante las fases de absorción y de eliminación. Durante el ensayo se determinan las concentraciones de la sustancia problema en los gusanos y en el suelo. En general, se miden las concentraciones totales en el suelo. Como opción pueden medirse las concentraciones en el agua intersticial; en tal caso, hay que aportar la justificación e indicar los métodos adecuados, antes del inicio del estudio, e incluir estos datos en el informe.

44. Se toman muestras de los gusanos y del suelo al menos en seis ocasiones durante las fases de absorción y de eliminación. Si se demuestra la estabilidad de la sustancia problema, puede reducirse el número de análisis del suelo. Se recomienda analizar al menos tres réplicas al inicio y al final de la fase de absorción. Si la concentración en el suelo medida al final de la fase de absorción se desvía de la concentración inicial en más del 30 %, será necesario analizar también las muestras de suelo en otras fechas.

45. En cada punto de muestreo se extraen los gusanos del suelo de una réplica dada (por ejemplo, después de extender el suelo de la réplica en una bandeja poco profunda, utilizando pinzas de joyero blandas) y se lavan rápidamente con agua en una bandeja poco profunda de vidrio o de acero. Se retira el exceso de agua (véase el punto 34). Se transfieren los gusanos con cuidado a un recipiente tarado y se pesan inmediatamente, incluido el contenido intestinal.

46. A continuación hay que dejar que los gusanos de tierra (*Eisenia* sp.) se purguen del contenido intestinal durante una noche, por ejemplo, en un papel de filtro húmedo puesto en una placa Petri cerrada (véase el punto 34). Tras la purga, debe determinarse el peso de los gusanos para evaluar una posible disminución de la biomasa durante el ensayo (véanse los criterios de validez en el punto 17). La pesada y el análisis tisular de los enquitreidos se efectúan sin purgar, ya que tales operaciones resultan difíciles técnicamente debido al pequeño tamaño de estos gusanos. Tras la determinación final del peso, los gusanos se matan inmediatamente, utilizando el método más adecuado (por ejemplo, con nitrógeno líquido, o congelando por debajo de – 18 °C).

47. Durante la fase de eliminación, los gusanos van sustituyendo por suelo limpio el contenido intestinal contaminado. Esto significa que las mediciones de gusanos sin purgar (enquitreidos en este contexto) muestreados justo antes de la fase de eliminación incluyen el suelo contaminado presente en el intestino. Respecto a los oligoquetos acuáticos se acepta que, tras las primeras 4-24 h de la fase de eliminación, la mayor parte del contenido intestinal contaminado ha sido sustituido por sedimento limpio [véase, por ejemplo, (46)]. Se han comunicado observaciones similares en relación con los gusanos de tierra en estudios sobre la acumulación de cadmio y zinc radiomarcados (78). En los enquitreidos no purgados, la concentración de esta primera muestra de la fase de eliminación puede considerarse como la concentración tisular tras la purga intestinal. Para tener en cuenta la dilución de la concentración de la sustancia problema por el suelo no contaminado durante la fase de eliminación, es posible estimar el peso del contenido intestinal a partir de la relación entre el peso húmedo de los gusanos y el peso de las cenizas de los gusanos, o de la relación entre el peso seco de los gusanos y el peso de las cenizas de los gusanos.

▼M4

48. Es preferible analizar las muestras de suelo y de gusanos inmediatamente después de haberlas tomado (es decir, en el plazo de 1 o 2 días) para evitar la degradación y otras pérdidas, y se recomienda calcular las velocidades aproximadas de absorción y de eliminación según se va llevando a cabo el ensayo. Si se retrasa el análisis, las muestras deben conservarse siguiendo un método adecuado como, por ejemplo, mediante congelación (≤ –18 °C).

49. Hay que comprobar que la precisión y la reproducibilidad del análisis químico, así como la recuperación de la sustancia problema de las muestras de suelo y de gusanos, son satisfactorias para el método considerado; deben indicarse la eficiencia de la extracción, el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ). Análogamente hay que comprobar que la sustancia problema no es detectable en los recipientes de control a concentraciones superiores a la de fondo. Cuando la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo Ca es > 0 en los gusanos de control, debe incluirse en el cálculo de los parámetros cinéticos (véase el apéndice 2). Todas las muestras deben manipularse a lo largo de todo el ensayo de manera que se minimicen la contaminación y las pérdidas (por ejemplo, derivadas de la adsorción de la sustancia problema al dispositivo de muestreo).

50. Cuando se trabaja con sustancias problema radiomarcadas, es posible analizar la sustancia original y sus metabolitos. La cuantificación de la sustancia problema original y de sus metabolitos en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción proporciona importante información. Las muestras deben "limpiarse" después, de manera que pueda cuantificarse aparte la sustancia problema original. Si alguno de los distintos metabolitos supera el 10 % de la radiactividad total de la muestra o muestras analizadas, se recomienda identificarlo.

51. Hay que registrar y comunicar la recuperación total y la recuperación de la sustancia problema en gusanos, suelo y, si se utilizan, trampas que contengan absorbentes para retener la sustancia problema evaporada.

52. Es aceptable mezclar los individuos muestreados de un recipiente de ensayo dado en el caso de los enquitreidos, que son más pequeños que los gusanos de tierra. Si esa mezcla implica reducir el número de réplicas, quedan limitados los procedimientos estadísticos que pueden aplicarse a los datos. Si se necesitan un procedimiento y una potencia estadística específica, convendrá entonces utilizar en el ensayo un número adecuado de recipientes de ensayo replicados, para conciliar la mezcla con el procedimiento y la potencia deseados.

53. Se recomienda expresar el BAF tanto en función del peso seco total como, cuando se requiera (es decir, en el caso de las sustancias muy hidrofóbicas), en función del contenido lipídico. Deben aplicarse métodos adecuados para la determinación del contenido lipídico; a este propósito deben adaptarse algunos métodos existentes, véase por ejemplo (31) (58). Estos métodos aplican una técnica de extracción con cloroformo/metanol. Sin embargo, para evitar el uso de disolventes clorados debe utilizarse una modificación del método de Bligh y Dyer (9), como se describe en (17). Los diversos métodos pueden no dar valores idénticos, por lo que es importante precisar bien el método utilizado. Lo ideal es hacer el análisis de los lípidos, cuando sea posible (es decir, si se dispone de suficiente tejido de gusanos), con la misma muestra o extracto que se haya utilizado para el análisis de la sustancia problema, puesto que los lípidos deben a menudo retirarse del extracto antes de que este se pueda analizar por cromatografía (49). Otra posibilidad es utilizar animales del control para medir el contenido lipídico, el cual puede servir para normalizar los valores del BAF. Este último planteamiento reduce la contaminación del equipo con la sustancia problema.

▼M4

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

54. La curva de absorción de la sustancia problema se obtiene representando gráficamente su concentración en la superficie o el interior de los gusanos durante la fase de absorción en función del tiempo, con una escala aritmética. Cuando la curva ha alcanzado la fase de meseta, o un estado de equilibrio (véanse las definiciones en el apéndice 1), el factor de bioacumulación en el estado de equilibrio (BAFss) se calcula con ayuda de la fórmula siguiente;

$$\frac{C_a \text{ en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción (media)}}{C_s \text{ en el estado de equilibrio o al final de la fase de absorción (media)}}$$

$C_a$ es la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo

$C_s$ es la concentración de la sustancia problema en el suelo

55. Si no se alcanza el estado de equilibrio, debe determinarse el BAFk, a partir de las constantes de velocidad, en lugar del BAFss, como se describe a continuación:

— Determinar el factor de acumulación (BAFK) como la relación ks/ke.

— Es preferible calcular simultáneamente las constantes de absorción y de eliminación (véase la ecuación 11 del apéndice 2).

— La constante de la velocidad de eliminación ($k_e$) se calcula normalmente a partir de la curva de eliminación (es decir, la gráfica de la concentración de la sustancia problema en los gusanos durante la fase de eliminación). A continuación se calcula la constante de la velocidad de absorción $k_s$ a partir de $k_e$ y del valor de $C_a$ derivado de la curva de absorción; véase en el apéndice 2 una descripción de estos métodos. Para obtener el factor de bioconcentración BAFK y las constantes de velocidad $k_s$ y $k_e$ se utilizarán preferiblemente métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales. En caso de que la eliminación claramente no siga una cinética de primer orden, será necesario emplear otros modelos más complejos.

**Informe del ensayo**

56. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— Toda la información disponible sobre la toxicidad aguda o a largo plazo (por ejemplo $EC_x$, $LC_x$, NOEC) de la sustancia problema respecto a los oligoquetos que viven en el suelo.

— Pureza, naturaleza física y propiedades fisicoquímicas como, por ejemplo, log $K_{ow}$, hidrosolubilidad.

— Datos de identificación química, fuente de la sustancia problema, identidad y concentración de los eventuales disolventes utilizados.

— Si se utilizan sustancias problema radiomarcadas, la posición precisa de los átomos marcados, la radiactividad específica y la pureza radioquímica.

*Especie de ensayo:*

— Denominación científica, cepa, fuente, eventuales tratamientos previos, aclimatación, edad, rango de tamaños, etc.

▼M4

*Condiciones de ensayo:*

— Procedimiento de ensayo seguido.

— Tipo y características del alumbrado y del fotoperíodo o fotoperíodos utilizados.

— Diseño del ensayo (por ejemplo, número y tamaño de los recipientes de ensayo, masa de suelo y altura de la capa de suelo, número de réplicas, número de gusanos por réplica, número de concentraciones de ensayo, duración de las fases de absorción y eliminación, frecuencia del muestreo).

— Justificación de la elección del material de los recipientes de ensayo.

— Método de preparación y aplicación de la sustancia problema, así como motivos para elegir un método específico.

— Concentraciones de ensayo nominales, medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas en los recipientes de ensayo, y método de obtención de estos valores.

— Fuente de los componentes del suelo artificial o, si se utilizan medios naturales, origen del suelo, descripción de los eventuales tratamientos previos, resultados de los controles (supervivencia, desarrollo de la biomasa, reproducción), características del suelo (pH, contenido de carbono orgánico total, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), WHCmax, contenido porcentual de agua al inicio y al final del ensayo, y otras mediciones realizadas eventualmente).

— Información pormenorizada sobre el tratamiento de las muestras de suelo y de gusanos, incluidos datos de preparación, almacenamiento, adición de la sustancia problema, extracción y procedimientos (y precisión) del análisis de la sustancia problema en los gusanos y en el suelo y del contenido lipídico (si se mide), y recuperaciones de la sustancia problema.

*Resultados:*

— Mortalidad de los gusanos de control y de los gusanos de cada recipiente de ensayo, y eventuales comportamientos anormales observados (por ejemplo, evitación del suelo, ausencia de reproducción en un ensayo de bioacumulación con enquitreidos).

— Relación de peso seco a peso húmedo del suelo y de los organismos del ensayo (útil a efectos de normalización).

— Pesos húmedos de los gusanos a cada punto temporal de muestreo; en el caso de los gusanos de tierra, los pesos húmedos al inicio del ensayo y a cada punto temporal de muestreo antes y después de la purga intestinal.

— El contenido lipídico de los organismos de ensayo (si se determina).

— Curvas que indiquen las cinéticas de absorción y de eliminación de la sustancia problema en los gusanos y el tiempo hasta alcanzar el estado de equilibrio.

— $C_a$ y $C_s$ (con desviación típica y bandas, en caso adecuado) a todos los puntos temporales de muestreo ($C_a$ expresada g $kg^{-1}$ de peso húmedo y seco de cuerpo completo, $C_s$ expresada en g $kg^{-1}$ de peso húmedo y seco de suelo); si se necesita conocer el factor de acumulación biota-suelo (BSAF) (por ejemplo, a efectos de comparación de los resultados de dos o más ensayos realizados con animales de diferente contenido lipídico), $C_a$ puede expresarse además en g $kg^{-1}$ de contenido lipídico del organismo, y $C_s$ puede expresarse en g $kg^{-1}$ de carbono orgánico del suelo.

— BAF (expresado en kg de suelo·$kg^{-1}$ de gusanos), constante de la velocidad de absorción del suelo $k_s$ (expresada en g de suelo $kg^{-1}$ de gusanos $día^{-1}$), y constante de la velocidad de eliminación $k_e$ (expresada en $día^{-1}$); también puede indicarse adicionalmente el BSAF (expresado en kg de CO del suelo $kg^{-1}$ de contenido lipídico de los gusanos).

▼M4

— Los siguientes parámetros, si se miden: porcentajes de sustancia original, metabolitos, y residuos ligados (es decir, porcentaje de sustancia problema que no puede extraerse con métodos comunes de extracción) detectados en el suelo y en los animales de ensayo.

— Métodos utilizados para los análisis estadísticos de los datos.

*Evaluación de los resultados:*

— Cumplimiento de los resultados con los criterios de validez recogidos en el punto 17,

— resultados imprevistos o poco usuales como, por ejemplo, eliminación incompleta de la sustancia problema de los animales de ensayo.

*BIBLIOGRAFÍA:*

(1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Master thesis, University Coimbra.

(2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

(3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid potworm Enchytraeus albidus. ASTM International, E1676-04: 26 pp.

(4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation-New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235-276.

(5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (Eisenia andrei): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93-99.

(6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (Eisenia andrei): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154-165.

(7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (Eisenia andrei). Ecotox. Environ. Safety 31: 185-191.

(8) Bell AW (1958). The anatomy of Enchytraeus albidus, with a key to the species of the genus Enchytraeus. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1-13.

(9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911-917.

(10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.

(11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R & D No.: 298 64 416.

(12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes Enchytraeus luxuriosus and Enchytraeus albidus (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185-196.

(13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm Eisenia fetida. J. Soils Sediments 3: 13-20.

▼M4

(14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91-100.

(15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2-29.

(16) Didden W (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555-576.

(17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140-145.

(19) Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) nº 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión, así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión (DO L 396 de 30.12.2006, p. 1).

(20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). Biology and ecology of earthworms. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.

(21) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R & D No.: 204 67 458: 149 pp. Puede descargarse en la dirección: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf

(23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.

(24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195-208.

(26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

(27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501-1514.

(28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von g-1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm Lumbricus rubellus (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼M4

(29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF-Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78-84.

(30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225-1231.

(31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099-1105.

(32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701-707.

(33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15-20.

(34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59-81.

(35) ISO 11268-2 (1998) Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes en lombrices (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción.

(36) Jaenike J (1982). "*Eisenia foetida*" is two biological species. Megadrilogica 4: 6-8.

(37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080-2090.

(38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in Eisenia andrei (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953-961.

(39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (Eisenia andrei, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767-775.

(40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, Eisenia andrei (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399-3404.

(41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305-312.

(42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217-232.

(43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von $^{14}$C-Hexachlorbenzol und $^{14}$C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.

(44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588-595.

(45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in Lumbricus rubellus under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17-26.

(46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegates. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244-1249.

▼M4

(47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log $K_{ow}$/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.

(48) Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

(49) Capítulo C.13 del presente anexo. Bioconcentración: Ensayo dinámico con peces.

(50) Capítulo C.21 del presente anexo. Microorganismos del suelo: Ensayo de transformación del nitrógeno.

(51) OECD (2004a), Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(52) OECD (2004b), Earthworm reproduction test (Eisenia fetida/Eisenia Andrei), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.

(53) OECD (2008), Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochates, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris

(54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378-396.

(56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77-81.

(57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm Eisenia fetida. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

(58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431-1436.

(59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.

(60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.

(61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105-129.

(62) Romijn CA.FM, Luttik R, Van De Meent D, Slooff W,Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107-127.

(63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110-2120.

(64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413-433.

(65) Schmelz R and Collado R (1999). Enchytraeus luxuriosus sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93–100.

▼M4

(66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

(67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557–2563.

(68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309-320.

(69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67-81.

(70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167-1171.

(71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation-Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.

(72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277-285.

(74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).

(75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023-1033.

(76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409-417.

(77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm Eisenia fetida (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161-165.

(78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm Lumbricus rubellus exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843-1851.

(79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402–406.

▼M4

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Bioacumulación** es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo respecto a la concentración de esta sustancia en el medio ambiente. La bioacumulación es el resultado de procesos tanto de bioconcentración como de biomagnificación (véase más abajo).

**Bioconcentración** es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo derivado de la absorción de la sustancia solo a partir del medio circundante (es decir, a través de la superficie corporal y del suelo ingerido), respecto a la concentración de esta sustancia en el medio circundante.

**Biomagnificación** es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo derivado de la absorción a través de comida o presas contaminadas, respecto a la concentración de esta sustancia en la comida o en la presa. La biomagnificación puede provocar la transferencia o la acumulación de la sustancia dentro de redes alimentarias.

La **eliminación** de una sustancia problema es la pérdida de esta sustancia por parte del tejido del organismo de ensayo por procesos activos o pasivos que se producen independientemente de la presencia o ausencia de la sustancia en el medio circundante.

El **factor de bioacumulación** (BAF) en cualquier momento de la fase de absorción de este ensayo de bioacumulación es la concentración de la sustancia problema en la superficie o en el interior del organismo de ensayo ($C_a$ en $g \cdot kg^{-1}$ de peso seco de gusanos) dividida por la concentración de la sustancia en el medio circundante ($C_s$ en $g \cdot kg^{-1}$ de peso seco de suelo); la unidad del BAF es el kg de suelo$\cdot kg^{-1}$ de gusanos.

El **factor de bioacumulación en el estado de equilibrio** ($BAF_{ss}$) es el BAF en dicho estado y no cambia significativamente a lo largo de un período prolongado de tiempo, durante el cual se mantiene constante la concentración de la sustancia problema en el medio circundante ($C_s$ en $g.kg^{-1}$ de peso seco de suelo).

Los **factores de bioacumulación** calculados directamente a partir de la relación entre la constante de la velocidad de absorción del suelo y la constante de la velocidad de eliminación ($k_s$ y $k_e$, véase más adelante) se denominan factores de bioacumulación cinéticos ($BAF_K$).

El **factor de acumulación biota-suelo** (BSAF) es la concentración (normalizada teniendo en cuenta el contenido lipídico) de la sustancia problema en la superficie o en el interior del organismo de ensayo, dividida entre la concentración (normalizada teniendo en cuenta el contenido de carbono orgánico) de la sustancia problema en el suelo en el estado de equilibrio. $C_a$ se expresa entonces en $g \cdot kg^{-1}$ de contenido lipídico del organismo, y $C_s$ en $g \cdot kg^{-1}$ de carbono orgánico del suelo; la unidad del BSAF es el kg de carbono orgánico$\cdot kg^{-1}$ de lípidos.

La **meseta** o el **estado de equilibrio** se define como el equilibrio entre los procesos de absorción y de eliminación que se dan simultáneamente durante la fase de exposición. La fase de equilibrio se alcanza en la representación gráfica del BAF frente al tiempo cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos del BAF realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días presentan una diferencia máxima del ± 20 % entre sí, y no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres puntos temporales de muestreo. Si las sustancias problema se absorben con lentitud, es más apropiado que los intervalos sean semanales (49).

El **coeficiente de reparto carbono orgánico-agua** ($K_{oc}$) es la relación de la concentración de una sustancia en la fracción de carbono orgánico de un suelo respecto a su concentración en el agua, en equilibrio.

El **coeficiente de reparto octanol-agua** ($K_{ow}$) es la relación entre la solubilidad de una sustancia en n-octanol y en agua, en equilibrio; también se denomina $P_{ow}$. El logaritmo de $K_{ow}$ (log $K_{ow}$) se utiliza como indicación del potencial de bioacumulación de una sustancia por los organismos acuáticos.

▼**M4**

La **fase de absorción o de exposición** es el tiempo durante el cual los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema.

La **constante de la velocidad de absorción del suelo** ($k_s$) es el valor numérico que define la velocidad del aumento de la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo debido a la absorción desde la fase del suelo. $k_s$ se expresa en g de suelo $kg^{-1}$ de gusanos $d^{-1}$.

La **fase de eliminación** es el tiempo, tras la transferencia de los organismos de ensayo desde un medio contaminado a un medio exento de la sustancia problema, durante el cual se estudia la eliminación (o la pérdida neta) de la sustancia por los organismos de ensayo.

La **constante de la velocidad de eliminación** ($k_e$) es el valor numérico que define la velocidad de reducción de la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo, tras la transferencia de los organismos de ensayo desde un medio que contiene la sustancia problema hacia un medio exento de ella; $k_e$ se expresa en $d^{-1}$.

**Sustancia problema:** Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

▼M4

*Apéndice 2*

**Cálculo de los parámetros de absorción y de eliminación**

El parámetro principal del ensayo de bioacumulación es el factor de bioacumulación, el BAF. El BAF medido puede calcularse dividiendo la concentración en el organismo de ensayo, $C_a$, por la concentración en el suelo, $C_s$, en el estado de equilibrio. Si no se alcanza el estado de equilibrio durante la fase de absorción, en lugar del BAFss se calcula el $BAF_K$ a partir de las constantes de velocidad. Sin embargo, ha de señalarse si el BAF se refiere o no a las concentraciones en el estado de equilibrio.

El medio usual de obtener el factor de bioacumulación cinético ($BAF_K$), la constante de la velocidad de absorción del suelo ($k_s$) y la constante de la velocidad de eliminación ($k_e$) es emplear métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales, por ejemplo siguiendo los modelos descritos en (68). Dado un conjunto de datos secuenciales de concentración en el tiempo y las ecuaciones del modelo:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuación 1]}$$

o

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuación 2]}$$

donde:

$C_a$ = concentración de sustancia en los gusanos [g $kg^{-1}$ de peso húmedo o seco]

$k_s$ = constante de la velocidad de absorción en los tejidos [g de suelo $kg^{-1}$ de gusanos $d^{-1}$]

$C_a$ = concentración de sustancia en el suelo [g $kg^{-1}$ de peso húmedo o seco]

$k_e$ = constante de la velocidad de eliminación [$d^{-1}$]

$t_c$ = tiempo al final de la fase de absorción;

estos programas informáticos calculan los valores de $BAF_K$, $k_s$ y $k_e$.

Cuando la concentración de fondo en los gusanos no expuestos, por ejemplo en el día 0, se aparta significativamente de cero (como puede suceder, por ejemplo, con los metales), es necesario incluir la concentración de fondo ($C_{a,0}$) en estas ecuaciones, que así se convierten en las siguientes:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuación 3]}$$

y

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuación 4]}$$

En los casos en que se observe un descenso significativo de la concentración de la sustancia problema en el suelo a lo largo del tiempo durante la fase de absorción, pueden utilizarse los modelos siguientes, por ejemplo (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k}0^{t}) \qquad \text{[ecuación 5]}$$

▼M4

donde:

$C_s$ = concentración de sustancia en el suelo [g $kg^{-1}$ de peso húmedo o seco]

$k_0$ = constante de la velocidad de degradación en el suelo [$d^{-1}$]

$C_0$ = concentración inicial de sustancia en el suelo [g $kg^{-1}$ de peso húmedo o seco]

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuación 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[ecuación 7]}$$

donde:

$C_a$ = concentración de sustancia en los gusanos [g $kg^{-1}$ de peso húmedo o seco]

$k_s$ = constante de la velocidad de absorción en los tejidos [g de suelo $kg^{-1}$ de gusanos $d^{-1}$]

$k_0$ = constante de la velocidad de degradación en el suelo [$d^{-1}$]

$k_e$ = constante de la velocidad de eliminación [$d^{-1}$]

$t_c$ = tiempo al final de la fase de absorción.

Cuando se alcanza el estado de equilibrio durante la fase de absorción (es decir, t = ∞), la ecuación 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[ecuación 1]}$$

puede reducirse a:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

o

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[ecuación 8]}$$

Entonces, $k_s/k_e$ x $C_s$ es una aproximación de la concentración de la sustancia problema en el tejido de los gusanos en el estado de equilibrio ($C_{a,ss}$).

El factor de acumulación biota-suelo (BSAF) puede calcularse de la forma siguiente:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[ecuación 9]}$$

donde $f_{oc}$ es la fracción de carbono orgánico del suelo, y $f_{lip}$ es la fracción de lípidos de los gusanos, habiéndose determinado ambos valores preferentemente en muestras tomadas del ensayo, y referidos al peso seco o al peso húmedo.

La cinética de eliminación puede modelizarse utilizando los datos de la fase de eliminación y aplicando la siguiente ecuación modelo y un método informático de estimación de parámetros no lineales. Si la representación de los datos frente al tiempo indica un declive exponencial constante de la concentración de la sustancia problema en los animales, puede utilizarse un modelo monocompartimental (ecuación 9) para describir la evolución temporal de la eliminación.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[ecuación 10]}$$

▼**M4**

Los procesos de eliminación a veces resultan bifásicos, con un rápido declive de $C_a$ durante las primeras etapas, que luego se convierte en una pérdida más lenta de sustancia problema en las fases posteriores de la eliminación [véanse, por ejemplo, (27) (68)]. Las dos fases pueden interpretarse aceptando que hay dos compartimentos diferentes en el organismo, y la sustancia problema sale de cada uno de ellos a diferentes velocidades. En estos casos hay que consultar la bibliografía específica, como (38) (39) (40) (78).

Utilizando las ecuaciones modelo anteriores, es posible calcular también los parámetros cinéticos ($k_s$ y $k_e$) de una sola vez aplicando el modelo de cinética de primer orden a todos los datos de las fases tanto de absorción como de eliminación, simultáneamente. Para encontrar una descripción de un método que permita este cálculo combinado de las constantes de velocidad de absorción y de eliminación, pueden consultarse las referencias (41) (73) y (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \quad \text{[ecuación 11]}$$

*Nota:* Cuando los parámetros de absorción y de eliminación se estiman simultáneamente a partir de los datos combinados de absorción y de eliminación, el símbolo "m" de la ecuación 11 es un descriptor que permite al programa informático asignar los subtérminos de la ecuación a los conjuntos de datos de la fase respectiva y llevar a cabo la evaluación correctamente (m = 1 para la fase de absorción; m = 2 para la fase de eliminación).

No obstante, estas ecuaciones modelo deben emplearse con precaución, especialmente cuando durante el ensayo se producen cambios en la (bio)degradación o en la biodisponibilidad de la sustancia problema [véase, por ejemplo, (79)].

▼M4

*Apéndice 3*

EJEMPLOS DE CALENDARIOS DE ENSAYOS DE BIOACUMULACIÓN EN EL SUELO

**Ensayo con gusanos de tierra**

a) Fase de absorción con ocho fechas de muestreo para el cálculo de la cinética

| Día | Actividad |
|---|---|
| – 6 | Acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado. |
| – 4 | Adición de la solución de la sustancia problema a la fracción del suelo; evaporación de los eventuales disolventes; mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; equilibrado a las condiciones de ensayo durante 4 días (3 semanas en caso de adición de metales al suelo). |
| – 3 a – 1 | Separación de los organismos de ensayo del cultivo de aclimatación; preparación y humidificación de los componentes del suelo. |
| 0 | Medición de la temperatura y del pH del suelo; toma de muestras del suelo de los recipientes de tratamiento y de los controles de disolvente para determinar la concentración de la sustancia problema; adición de la ración alimentaria; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; conservación de suficientes submuestras de gusanos para la determinación de los valores analíticos de fondo, peso húmedo y seco, y contenido lipídico; pesada de todos los recipientes de ensayo para controlar la humedad del suelo; control del aporte de aire, si se utiliza un sistema de ensayo cerrado. |
| 1 | Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema. |
| 2 | Como el día 1. |
| 3 | Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura. |
| 4 | Como el día 1. |
| 5-6 | Como el día 3. |
| 7 | Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada. |
| 8-9 | Como el día 3. |
| 10 | Como el día 1. |
| 11-13 | Como el día 3. |
| 14 | Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada. |
| 15-16 | Como el día 3. |
| 17 | Como el día 1. |
| 18-20 | Como el día 3. |

▼**M4**

| Día | Actividad |
|---|---|
| 21 | Como el día 1; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; final de la fase de absorción; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio, para la fase de eliminación (sin purga intestinal); toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes. |
| | Las actividades previas a la exposición (fase de equilibrado) deben programarse teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia problema. |
| | Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables). |

b) Fase de eliminación

| Día | Actividad |
|---|---|
| – 6 | Preparación y humidificación de los componentes del suelo; acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado. |
| – 4 | Mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; incubación a las condiciones de ensayo durante 4 días. |
| 0 (final de la fase de absorción) | Medición de la temperatura y del pH del suelo; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; adición de la ración alimentaria; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio; toma de muestras de suelo y de gusanos al cabo de 4 – 6 horas para determinar la concentración de la sustancia problema. |
| 1 | Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema. |
| 2 | Como el día 1. |
| 3 | Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura. |
| 4 | Como el día 1. |
| 5-6 | Como el día 3. |
| 7 | Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada. |
| 8-9 | Como el día 3. |
| 10 | Como el día 1. |
| 11-13 | Como el día 3. |
| 14 | Como el día 1; adición de la ración alimentaria; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada. |
| 15-16 | Como el día 3. |
| 17 | Como el día 1. |

▼**M4**

| Día | Actividad |
|---|---|
| 18-20 | Como el día 3. |
| 21 | Como el día 1; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes. |
| | La preparación del suelo antes del inicio de la fase de eliminación debe hacerse de la misma forma que antes de la fase de absorción. |
| | Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables). |

**Ensayo con enquitreidos**

a) Fase de absorción con ocho fechas de muestreo para el cálculo de la cinética

| Día | Actividad |
|---|---|
| – 6 | Acondicionamiento durante 48 h del suelo preparado. |
| – 4 | Adición de la solución de la sustancia problema a la fracción del suelo; evaporación de los eventuales disolventes; mezcla de los componentes del suelo; distribución del suelo en los recipientes de ensayo; equilibrado a las condiciones de ensayo durante 4 días (3 semanas en caso de adición de metales al suelo). |
| -3 a -1 | Separación de los organismos de ensayo del cultivo de aclimatación; preparación y humidificación de los componentes del suelo. |
| 0 | Medición de la temperatura y del pH del suelo; toma de muestras del suelo de los recipientes de tratamiento y de los controles de disolvente para determinar la concentración de la sustancia problema; adición de la ración alimentaria al suelo; pesada y distribución aleatorizada de los gusanos en los recipientes de ensayo; conservación de suficientes submuestras de gusanos para la determinación de los valores analíticos de fondo, peso húmedo y seco, y contenido lipídico; pesada de todos los recipientes de ensayo para controlar la humedad del suelo; control del aporte de aire, si se utiliza un sistema de ensayo cerrado. |
| 1 | Control del aporte de aire, registro del comportamiento de los gusanos y de la temperatura; toma de muestras de suelo y de gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema. |
| 2 | Como el día 1. |
| 3 | Control del aporte de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura. |
| 4 | Como el día 1. |
| 5-6 | Como el día 3. |
| 7 | Como el día 1; adición de la ración alimentaria al suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo y compensación del agua evaporada. |
| 9 | Como el día 1. |
| 10 | Como el día 3. |

▼**M4**

| Día | Actividad |
|---|---|
| 11 | Como el día 1. |
| 12-13 | Como el día 3. |
| 14 | Como el día 1; adición de la ración alimentaria al suelo; medición de la temperatura y del pH del suelo; control de la humedad del suelo volviendo a pesar los recipientes de ensayo; final de la fase de absorción; transferencia de los gusanos de las réplicas expuestas restantes a recipientes que contienen suelo limpio, para la fase de eliminación (sin purga intestinal); toma de muestras de suelo y de gusanos para los controles de los disolventes. |
| | Las actividades previas a la exposición (fase de equilibrado) deben programarse teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia problema. |
| | Las actividades descritas para el día 3 deben realizarse diariamente (al menos en los días laborables). |

▼M4

*Apéndice 4*

**Suelo artificial — recomendaciones de preparación y conservación**

Dado que es posible que no se disponga durante todo el año de suelos naturales de una fuente particular, y que la presencia de organismos endógenos y de microcontaminantes puede influir en el ensayo, se recomienda emplear en este ensayo el suelo artificial indicado en el capítulo C.8 del presente anexo, Toxicidad para gusanos de tierra (48). Son varias las especies de ensayo que pueden sobrevivir, crecer y reproducirse en este suelo, y se facilita con él una normalización máxima, así como la comparabilidad intra e interlaboratorios de las condiciones de ensayo y de cultivo.

Componentes del suelo:

| | | |
|---|---|---|
| Turba: | 10 % | Turba esfágnea, de acuerdo con las directrices 207 de la OCDE (48), |
| Arena de cuarzo: | 70 % | Arena de cuarzo industrial (secada al aire); granulometría: más del 50 % de las partículas debe estar en la banda de 50-200 μm, pero todas las partículas deben tener ≤ 2 mm, |
| Caolín: | 20 % | Contenido en caolinita ≥ 30 %, |
| Carbonato de calcio: | ≤ 1 % | $CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro. |

Como opción, puede reducirse el contenido de carbono orgánico del suelo artificial como, por ejemplo, rebajando el contenido de turba al 4-5 % de suelo seco y aumentando análogamente el contenido de arena. Con esta reducción del contenido de carbono orgánico, es posible que disminuyan las posibilidades de adsorción de la sustancia problema al suelo (carbono orgánico) y que aumente la disponibilidad de la sustancia problema para los gusanos (74). Se ha demostrado que *Enchytraeus albidus* y *Eisenia fetida* pueden ajustarse a los criterios de validez sobre la reproducción cuando se someten a ensayo en suelos de campo con un contenido menor de carbono orgánico como, por ejemplo, del 2,7 % (33) (61), y la experiencia demuestra que esto también puede conseguirse en suelo artificial con un 5 % de turba.

**Preparación**

Los componentes secos del suelo se mezclan a fondo (por ejemplo, en un mezclador de laboratorio de gran escala). Esta operación debe efectuarse alrededor de una semana antes de que se inicie el ensayo. La mezcla de componentes secos del suelo debe humedecerse con agua desionizada, al menos 48 h antes de que se añada la sustancia problema a fin de equilibrar o estabilizar la acidez. Para la determinación del pH se utiliza una mezcla de suelo y solución 1 M de KCl en la proporción de 1:5. Si el pH no se encuentra en la banda necesaria (6,0 ± 0,5), se añade al suelo una cantidad suficiente de $CaCO_3$ o se prepara un nuevo lote de suelo.

Se determina de acuerdo con la norma ISO 11268-2 (35) la capacidad de retención de agua (WHC) máxima del suelo artificial. Al menos dos días antes del inicio del ensayo, el suelo artificial seco se humedece añadiéndole una cantidad suficiente de agua desionizada o reconstituida para obtener aproximadamente la mitad del contenido final de agua. El contenido final de agua debe estar entre el 40 y el 60 % del WHC máximo. Al inicio del ensayo, el suelo previamente humedecido se divide en tantos lotes como concentraciones de ensayo y controles se vayan a emplear en el ensayo, y el contenido de humedad se ajusta al 40 – 60 % del $WHC_{max}$ utilizando la solución de la sustancia problema o añadiendo agua desionizada o reconstituida. Se determina el contenido de humedad al inicio y al final del ensayo (a 105 °C). El resultado debe ser óptimo para los requisitos de la especie utilizada (también es posible comprobar el contenido de humedad de la manera siguiente: cuando el suelo se aprieta suavemente con la mano, deben aparecer gotitas de agua entre los dedos).

▼M4

**Almacenamiento**

Los componentes secos del suelo artificial pueden conservarse a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización. El suelo preparado, humedecido previamente, puede conservarse en un lugar fresco hasta tres días antes de que se le añada la sustancia problema; debe velarse por reducir al mínimo la evaporación de agua. Una vez se le haya añadido la sustancia problema, el suelo debe utilizarse inmediatamente, salvo que se disponga de información en el sentido de que ese suelo concreto puede conservarse sin que se vea afectada la toxicidad ni la biodisponibilidad de la sustancia problema. En tal caso, es posible conservar, en las condiciones recomendadas para el ensayo concreto, las muestras de suelo con la sustancia problema añadida hasta el momento de su análisis.

▼M4

*Apéndice 5*

**Especies de oligoquetos recomendadas para el ensayo de bioacumulación a partir del suelo**

**Gusanos de tierra**

La especie recomendada para el ensayo es *Eisenia fetida* (Savigny 1826), que pertenece a la familia Lumbricidae. Desde 1972 está dividida en dos subespecies [*Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* (10)]. Según Jaenike (36), se trata de verdaderas especies aparte. *Eisenia fetida* se reconoce fácilmente por sus rayas intersegmentales de color amarillo claro, mientras que *Eisenia andrei* tiene color rojo oscuro uniforme. Proceden probablemente de la region del mar Negro, y actualmente tienen una distribución universal, especialmente en hábitats modificados antropogénicamente, como las pilas de compost. Las dos especies pueden utilizarse en ensayos tanto ecotoxicológicos como de bioacumulación.

*Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* están disponibles en el comercio, por ejemplo como cebos de pesca. En comparación con otros gusanos de tierra lumbrícidos, tienen un ciclo de vida breve y alcanzan la madurez en el plazo de unos 2 o 3 meses (a temperatura ambiente). Su temperatura óptima es de unos 20 – 24 °C; prefieren sustratos relativamente húmedos, con un pH casi neutro y un elevado contenido de materia orgánica. Como estas especies llevan unos 25 años utilizándose ampliamente en ensayos ecotoxicológicos normalizados, su cultivo se conoce muy bien (48) (77).

Ambas especies pueden cultivarse en una amplia gama de residuos animales. El medio de cría recomendado por la ISO (35) es una mezcla al 50 % de estiércol de caballo o de vaca y de turba. Este medio debe tener un valor aproximado de pH entre 6 y 7 (regulado con carbonato de calcio) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mS/cm o menos del 0,5 % de concentración salina), y no debe presentar una contaminación excesiva de amoníaco ni de orina animal. También puede utilizarse un suelo comercial de jardinería exento de aditivos, o un suelo artificial de acuerdo con la OCDE (48), o una mezcla de ambos al 50 %. El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado. Son adecuados los incubadores de un volumen entre 10 y 50 litros.

Para obtener gusanos de edad y masa normalizadas, lo mejor es iniciar el cultivo con capullos. Por tanto, se añaden gusanos adultos a un incubador que contenga sustrato fresco para producir capullos. La experiencia práctica indica que se obtienen buenas tasas de reproducción con una densidad de población de unos 100 gusanos adultos por kg de sustrato (peso húmedo). Tras 28 días se extraen los gusanos adultos. Los gusanos de tierra que salen de los capullos se utilizan para los ensayos una vez hayan madurado, al cabo de un mínimo de 2 meses y un máximo de 12 meses.

Los gusanos de las especies antes descritas pueden considerarse sanos si se mueven a través del sustrato, no intentan abandonarlo y se reproducen continuamente. Un movimiento muy lento o un color amarillo en el extremo posterior (en el caso de *Eisenia fetida*) son indicativos de agotamiento del sustrato. En este caso, se recomienda añadir sustrato fresco o rebajar el número de animales por incubador.

**Bibliografía adicional seleccionada**

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1-58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1-81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49-55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180-201.

▼M4

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1-171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology-from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331-338 pp.

**Enquitreidos**

La especie recomendada es *Enchytraeus albidus,* Henle 1837 (gusano blanco). Esta especie es una de las más grandes (hasta 15 mm) de la familia Enchytraeidae de los anélidos oligoquetos y presenta una distribución universal [véase, por ejemplo, (8)]. *Enchytraeus albidus* se encuentra en hábitats marinos, lacustres y terrestres, sobre todo en materia orgánica en descomposición (algas, compost) y raramente en praderas (42). Esta amplia tolerancia ecológica y algunas variaciones morfológicas indican que la especie podría tener diferentes razas.

*Enchytraeus albidus* se encuentra en el comercio, vendida como alimento para peces. Ha de comprobarse si el cultivo está contaminado con otras especies, generalmente más pequeñas (60). Si se da la contaminación, hay que lavar todos los gusanos con agua en una placa Petri. Después se seleccionan ejemplares adultos grandes de *Enchytraeus albidus* (empleando un microscopio estereoscópico) para iniciar un nuevo cultivo. Se desechan todos los demás gusanos. Tienen un breve ciclo de vida, ya que alcanzan la madurez entre los 33 días (a 18 °C) y los 74 días (a 12 °C). Solo deben utilizarse para los ensayos los cultivos que hayan estado en el laboratorio al menos 5 semanas (una generación) sin problemas.

También son adecuadas otras especies del género *Enchytraeus,* en particular *Enchytraeus luxuriosus.* Esta especie es un verdadero habitante del suelo, que se ha descrito recientemente en (65). Si se utilizan otras especies de *Enchytraeus,* deben identificarse claramente y hay que indicar los motivos por los que se han seleccionado.

*Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992) es una especie que pertenece al mismo grupo que *Enchytraeus luxuriosus.* No se ha determinado con certeza si existe en el campo, ya que solo se ha descrito a partir de cultivos de gusanos de tierra y de pilas de compost (Römbke 2003). Por tanto, no se conocen sus requisitos ecológicos originales. Sin embargo, en estudios de laboratorio recientes en varios suelos de campo se ha confirmado que esta especie muestra una amplia tolerancia respecto a propiedades del suelo como el pH y la textura (Jänsch *et al.* 2005). En los últimos años se está utilizando esta especie con frecuencia en estudios ecotoxicológicos debido a la simplicidad de su cultivo y de sus ensayos, por ejemplo según Kuperman *et al.* 2003). Sin embargo, es pequeña (3 – 12 mm; 7 mm de media (Westheide & Müller 1996), lo que hace que sea más difícil de manejar que *Enchytraeus albidus.* Cuando se utiliza esta especie en lugar de *Enchytraeus albidus,* es posible reducir el tamaño del recipiente de ensayo, aunque no es necesario. Por otra parte, ha de tenerse en cuenta que esta especie se reproduce muy rápidamente, con un tiempo de generación inferior a 20 días a 20 ± 2 °C (Achazi *et al.* 1999) e incluso más deprisa a temperaturas más altas.

Los enquitreidos de la especie *Enchytraeus albidus* (así como otras especies del género *Enchytraeus*) pueden criarse en grandes cajas de plástico (por ejemplo, de 30 × 60 × 10 cm o 20 × 12 × 8 cm, que es adecuado para el cultivo de gusanos de pequeño tamaño) llenas de una mezcla de suelo artificial y de suelo de jardín comercial, sin contaminar y exento de aditivos. Debe evitarse material de compost, ya que podría contener sustancias tóxicas, como metales pesados. Antes de utilizar el suelo de cultivo hay que eliminar la fauna, congelándolo tres veces. También puede utilizarse suelo artificial puro, pero la tasa de reproducción podría ser menor que la obtenida con sustratos mixtos. El sustrato debe tener un pH de 6,0 ± 0,5. El cultivo se mantiene en un incubador a la temperatura de 15 ± 2 °C a oscuras. En cualquier caso, ha de evitarse una temperatura superior a 23 °C. El suelo artificial/natural debe estar húmedo, pero no demasiado mojado. Cuando se aprieta el suelo suavemente con la mano, solo deben aparecer gotitas de agua. En todo caso hay que evitar las condiciones anóxicas (es decir, si se utiliza tapa, el número de agujeros de esta debe bastar para que sea suficiente la renovación del aire). El suelo del cultivo debe airearse removiéndolo cuidadosamente una vez por semana.

▼M4

Debe darse alimento a los gusanos *ad libitum* al menos una vez por semana con granos aplastados de avena que se introducen en una cavidad de la superficie del suelo y se recubren con suelo. Si queda comida en el recipiente desde la última vez que se les haya dado, será necesario ajustar en consecuencia la cantidad de alimento dado. Si se aprecia crecimiento fúngico en la comida restante, será necesario sustituir esta por una nueva cantidad de granos aplastados de avena. Para estimular la reproducción, es posible complementar cada dos semanas los granos aplastados de avena utilizando proteínas en polvo con vitaminas añadidas, disponibles en el comercio. Al cabo de tres meses, los animales se transfieren a un sustrato de cría o cultivo recién preparado. Los granos aplastados de avena, que deben conservarse en recipientes herméticamente cerrados, tienen que pasarse por el autoclave o calentarse antes de su utilización para evitar infecciones por ácaros de la harina (por ejemplo, *Glyzyphagus* sp., Astigmata, Acarina) o ácaros depredadores [por ejemplo, *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles,* Gamasida, Acarina]. Tras su desinfección, el alimento se muele de forma que sea fácil de espolvorear sobre la superficie del suelo. Otra posible fuente de alimento es la levadura de panadería o la comida para peces TetraMin®.

En general, las condiciones de cultivo son suficientes si los gusanos no intentan abandonar el sustrato, se mueven rápidamente por el suelo, presentan una superficie externa brillante sin que se les adhieran partículas del suelo, presentan un color más o menos blanquecino, y se observan gusanos de diferentes edades. En realidad, puede considerarse que los gusanos están sanos si se reproducen continuamente.

**Bibliografía adicional seleccionada**

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117-126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51-83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651-656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607-616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263-267.

▼M6

## C.31. ENSAYO CON PLANTAS TERRESTRES: ENSAYO DE EMERGENCIA Y CRECIMIENTO DE PLÁNTULAS

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 208 (2006). Los métodos de ensayo se revisan periódicamente en función de los avances científicos y de su aplicabilidad con fines reglamentarios. La presente actualización del método de ensayo está diseñada para evaluar los efectos potenciales de las sustancias sobre la emergencia y el crecimiento de plántulas. Sin embargo, no cubre los efectos crónicos ni los efectos sobre la función reproductora (es decir, semillas, formación de las flores, maduración de los frutos). Deben considerarse las condiciones de exposición y las propiedades de la sustancia problema, a fin de garantizar que se utilizan los métodos de ensayo apropiados (por ejemplo, cuando se estudian metales o compuestos metálicos, deben considerarse los efectos del pH y los contra-iones asociados) (1). Este método de ensayo no se ocupa de las plantas expuestas a vapores de las sustancias. El método de ensayo es aplicable a los ensayos de sustancias y mezclas en general, biocidas y productos fitosanitarios (también conocidos como plaguicidas o pesticidas). Se ha desarrollado sobre la base de métodos existentes (2) (3) (4) (5) (6) (7). También se han tenido en cuenta otras referencias pertinentes para los ensayos con plantas (8) (9) (10). En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

2. El ensayo evalúa los efectos sobre la emergencia y el crecimiento inicial de las plántulas de vegetales superiores tras su exposición a la sustancia problema en el suelo (u otra matriz de suelo adecuada). Las semillas se ponen en contacto con suelo que se ha tratado con la sustancia problema y se evalúan los efectos que presenten después de, generalmente, entre 14 y 21 días tras la emergencia del 50 % de las plántulas del grupo de control. Los parámetros medidos son la evaluación visual de la emergencia de plántulas, el peso seco de los brotes (o el peso fresco de los brotes) y, en algunos casos, la altura de los brotes, así como una evaluación de los efectos nocivos sobre diferentes partes de la planta. Estas mediciones y observaciones se comparan con las de las plantas de control sin tratar.

3. En función de la vía de exposición prevista, la sustancia problema se incorpora al suelo (o bien a una matriz de suelo artificial) o se aplica a la superficie del suelo, de forma que se represente adecuadamente la posible vía de exposición a la sustancia. La incorporación al suelo se realiza por tratamiento de suelo bruto. Después de la aplicación, el suelo se transfiere a macetas y, a continuación, se siembran en el suelo semillas de la especie vegetal seleccionada. Las aplicaciones en superficie se hacen con suelo en macetas en el que ya se han sembrado las semillas. Las unidades de ensayo (controles y suelos tratados más semillas) se colocan entonces en condiciones adecuadas que permitan la germinación o el crecimiento de las plantas.

4. El ensayo puede efectuarse con el fin de determinar la curva dosis-respuesta, o a una sola concentración/tasa como ensayo límite, en función del objetivo del estudio. Si los resultados del ensayo a concentración/tasa única superan un determinado nivel de toxicidad (por ejemplo, si se observan efectos superiores a un x %), se lleva a cabo un ensayo de determinación del intervalo para establecer los límites inferior y superior de toxicidad, seguido de un ensayo a concentración/tasa múltiple para generar una curva dosis-respuesta. Se efectúa un análisis estadístico apropiado para obtener una concentración con efecto x $EC_x$ o una tasa de aplicación con efecto x $ER_x$ (p. ej., $EC_{25}$, $ER_{25}$, $EC_{50}$, $ER_{50}$) en relación con el parámetro o parámetros de interés más sensibles. Asimismo, en esta prueba pueden calcularse la concentración sin efecto observado (NOEC) y la concentración mínima con efecto observado (LOEC).

### INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

5. La siguiente información es útil para la identificación de la vía prevista de exposición a la sustancia y para el diseño del ensayo: fórmula estructural, pureza, hidrosolubilidad, solubilidad en disolventes orgánicos, coeficiente

▼M6

de reparto 1-octanol/agua, comportamiento de sorción del suelo, presión de vapor, estabilidad de la sustancia en el agua y a la luz, y biodegradabilidad.

VALIDEZ DEL ENSAYO

6. Para que el ensayo se considere válido, los controles deben cumplir los criterios de comportamiento siguientes:

— la emergencia de las plántulas es de al menos un 70 %;

— las plántulas no presentan efectos fitotóxicos visibles (p. ej., clorosis, necrosis, marchitamiento, deformaciones de las hojas y tallos) y las plantas presentan solo variaciones en el crecimiento y morfología que son normales para la especie concreta de que se trate;

— la supervivencia media de las plántulas de control emergidas es de al menos el 90 % a lo largo de todo el estudio;

— las condiciones ambientales de una determinada especie son idénticas y los medios de cultivo contienen la misma cantidad de matriz de suelo, medio de apoyo, o sustrato de la misma fuente.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

7. Puede someterse a ensayo una sustancia de referencia a intervalos regulares, con el fin de comprobar que el comportamiento del ensayo y la respuesta de las plantas concretas del ensayo, así como las condiciones de ensayo no han cambiado de forma significativa a lo largo del tiempo. Los datos anteriores de biomasa o de crecimiento de los controles pueden utilizarse también para evaluar el comportamiento del sistema de ensayo en laboratorios concretos, y pueden constituir una medida de control de la calidad intralaboratorio.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Suelo natural — sustrato artificial**

8. Se pueden cultivar las plantas en macetas con suelo de limo arenoso, de arena limosa, o de limo arenoso y arcilloso, que contenga hasta un 1,5 % de carbono orgánico (alrededor del 3 % de materia orgánica). También puede utilizarse tierra comercial para macetas o mezcla de suelo sintético que contenga hasta un 1,5 % de carbono orgánico. No deben utilizarse suelos arcillosos si se sabe que la sustancia problema tiene elevada afinidad por la arcilla. El suelo de campo debe pasarse por un tamiz de 2 mm de luz para homogeneizarlo y eliminar las partículas gruesas. Deben indicarse el tipo y la textura, el porcentaje de carbono orgánico, el pH y el contenido de sal, así como la conductividad electrónica del suelo preparado final. El suelo debe clasificarse con arreglo a un sistema de clasificación normal (11). El suelo puede pasteurizarse o someterse a tratamiento térmico para reducir el efecto de los patógenos del suelo.

9. El suelo natural puede complicar la interpretación de los resultados y aumentar la variabilidad debido a su diversidad de propiedades físicas y químicas y de poblaciones microbianas. Estas variables, a su vez, alteran la capacidad de retención de humedad, la capacidad de formar enlaces químicos, la aireación y el contenido de nutrientes y de oligoelementos. Además de las variaciones de estos factores físicos, también habrá variaciones en sus propiedades químicas, tales como el pH y el potencial redox, lo que puede afectar a la biodisponibilidad de la sustancia problema (12) (13) (14).

10. Los sustratos artificiales no se emplean normalmente para los ensayos de productos fitosanitarios, pero pueden ser de utilidad para los ensayos de sustancias o mezclas en general o cuando se desee reducir al mínimo la variabilidad de los suelos naturales y aumentar la comparabilidad de los resultados de los ensayos. Los sustratos utilizados deben estar compuestos de materiales inertes que minimicen la interacción con la sustancia problema, con el vehículo disolvente, o con ambos. Se ha visto que la arena de cuarzo lavada con ácido, la lana mineral y las perlas de vidrio (por ejemplo, de 0,35 a 0,85 mm de diámetro) son materiales inertes adecuados que

▼M6

absorben mínimamente la sustancia problema (15), garantizando así un máximo de disponibilidad de la sustancia para las plántulas a través de la absorción radicular. Entre los sustratos inadecuados figuran la vermiculita, la perlita y otros materiales muy absorbentes. Deben facilitarse nutrientes para el crecimiento vegetal, a fin de asegurarse de que las plantas no sufren deficiencias nutricionales, y, siempre que sea posible, este aspecto debe evaluarse mediante análisis químico o por examen visual de las plantas de control.

**Criterios de selección de las especies de ensayo**

11. Las especies seleccionadas deben ser suficientemente amplias, p. ej., teniendo en cuenta su diversidad taxonómica en el reino vegetal, su distribución, abundancia, las características del ciclo de vida específico de la especie y la región de presencia natural, a fin de desarrollar una gama de respuestas (8) (10) (16) (17) (18) (19) (20). Para la selección deben tenerse en cuenta las siguientes características de las posibles especies de ensayo:

— las especies tienen semillas uniformes que están fácilmente disponibles a partir de fuentes normales fiables y que presentan una germinación regular, fiable y homogénea, y las plántulas tienen un crecimiento uniforme;

— las plantas son aptas para el ensayo en laboratorio, y pueden dar resultados fiables y reproducibles, tanto dentro de una misma instalación como en una serie de instalaciones;

— la sensibilidad de las especies sometidas a ensayo debe ser coherente con las respuestas de las plantas observadas en el medio ambiente expuestas a la sustancia;

— se han utilizado en cierta medida en ensayos anteriores de toxicidad y su utilización en, por ejemplo, bioensayos de herbicidas, detección de metales pesados, pruebas de resistencia a la salinidad o a los minerales, o estudios de alelopatía indica sensibilidad a una gran variedad de factores de estrés;

— son compatibles con las condiciones de cultivo del método de ensayo;

— cumplen los criterios de validez del ensayo.

Algunas de las especies de ensayo más utilizadas a lo largo del tiempo se recogen en el apéndice 2, y el apéndice 3 muestra posibles especies no cultivadas.

12. El número de especies que se ha de someter a ensayo depende de los requisitos normativos correspondientes, por lo que no se especifica en el presente método de ensayo.

**Aplicación de la sustancia problema**

13. La sustancia debe aplicarse en un vehículo adecuado (por ejemplo, agua, acetona, etanol, polietilenglicol, goma arábiga, arena). También pueden someterse a ensayo las mezclas (productos formulados o formulaciones) que contienen principios activos y varios coadyuvantes.

*Incorporación al suelo o al sustrato artificial*

14. Las sustancias que son hidrosolubles o se suspenden en agua pueden añadirse al agua y, a continuación, la solución se mezcla con el suelo, mediante un dispositivo de mezcla. Este tipo de ensayo puede ser adecuado si la exposición a la sustancia se hace a través del suelo o del agua intersticial del suelo y cuando hay riesgo de absorción radicular. La adición de la sustancia problema no debe superar la capacidad de retención de humedad del suelo. El volumen de agua añadida debe ser el mismo para cada concentración de ensayo, pero debe limitarse para evitar que el suelo se aglutine en agregados.

▼**M6**

15. Las sustancias con poca hidrosolubilidad han de disolverse en un disolvente volátil adecuado (p. ej., acetona, etanol), y mezclarse con arena. El disolvente puede eliminarse de la arena a continuación con una corriente de aire al tiempo que se remueve continuamente la arena. La arena tratada se mezcla con el suelo experimental. Se establece un segundo control que solo recibe arena y disolvente. Se añaden a todos los niveles de tratamiento y al segundo control las mismas cantidades de arena, con disolvente mezclado y eliminado. En el caso de sustancias problema sólidas insolubles, se mezclan la sustancia y el suelo seco en un mezclador adecuado. A continuación se añade el suelo a las macetas y se siembran las semillas de forma inmediata.

16. Cuando se utiliza un sustrato artificial en lugar de suelo, las sustancias hidrosolubles pueden disolverse en la solución de nutrientes justo antes del inicio del ensayo. Las sustancias que no son hidrosolubles, pero que pueden suspenderse en agua utilizando un vehículo disolvente, deben añadirse con el vehículo a la solución de nutrientes. Las sustancias que no son hidrosolubles y para las que no se dispone de ningún vehículo hidrosoluble no tóxico han de disolverse en un disolvente volátil adecuado. La solución se mezcla con arena o perlas de vidrio, se coloca en un aparato rotativo de vacío y se somete a evaporación, para que quede en la arena o en las perlas una capa uniforme de la sustancia. Una porción pesada de perlas debe someterse a extracción con el mismo disolvente orgánico y se determina en ella la sustancia problema, antes de llenar las macetas.

*Aplicación en superficie*

17. En el caso de los productos fitosanitarios, para la aplicación de la sustancia problema se suele rociar la superficie del suelo con la solución de ensayo. Todos los equipos utilizados para realizar los ensayos, incluidos los equipos utilizados para preparar y administrar la sustancia problema, deben ser tales en cuanto a su diseño y capacidad que los ensayos correspondientes puedan realizarse de una manera exacta y que se obtenga una cobertura reproducible. La cobertura debe ser uniforme en todas las superficies del suelo. Se debe tener cuidado para evitar la posibilidad de que las sustancias se adsorban o reaccionen con el equipo (por ejemplo, tubos de plástico y sustancias lipofílicas, o piezas y elementos de acero). Se rocía la sustancia problema en la superficie del suelo simulando las aplicaciones de un tanque de pulverización normal. Generalmente, los volúmenes rociados deben encontrarse en la banda de la práctica agrícola y volúmenes normales (cantidad de agua, etc.). El tipo de boquilla debe seleccionarse para proporcionar una cobertura uniforme de la superficie del suelo. En caso de que se apliquen disolventes y vehículos, debe establecerse un segundo grupo de plantas de control que reciban solo el disolvente o vehículo. Ello no es necesario en el caso de los productos fitosanitarios ensayados como formulaciones.

*Verificación de la concentración/tasa de la sustancia problema*

18. Las concentraciones o tasas de aplicación deben confirmarse mediante una verificación analítica adecuada. En el caso de las sustancias solubles, la verificación de todas las concentraciones/tasas de ensayo puede confirmarse mediante el análisis de la concentración máxima de la solución de ensayo utilizada para el ensayo con documentación sobre la posterior dilución y la utilización de equipo de aplicación calibrado (por ejemplo, material analítico de vidrio, calibración del equipo rociador). En el caso de las sustancias insolubles, la verificación del material compuesto debe aportarse con los pesos de la sustancia problema añadidos al suelo. Si se requiere la demostración de la homogeneidad, puede ser necesario analizar el suelo.

PROCEDIMIENTO

**Diseño del ensayo**

19. Se plantan en macetas semillas de la misma especie. El número de semillas plantadas por maceta dependerá de la especie, del tamaño de la maceta y de la duración del ensayo. El número de plantas por maceta debe proporcionar unas condiciones de crecimiento adecuadas y evitar la superpoblación durante todo el ensayo. La densidad de plantación máxima es de unas 3-10 semillas por 100 $cm^2$, en función del tamaño de las semillas. Como ejemplo,

▼M6

se recomienda de una a dos plantas de maíz, soja, tomate, pepino o remolacha azucarera por recipiente de 15 cm; tres plantas de colza o guisantes por recipiente de 15 cm; y de cinco a diez plantas de cebolla, trigo, u otras semillas pequeñas por recipiente de 15 cm. El número de semillas y el de macetas replicadas (la réplica se define como una maceta, por lo que las plantas de una misma maceta no constituyen réplicas) deben ser adecuados para optimizar el análisis estadístico (21). Debe tenerse en cuenta que la variabilidad será mayor cuando se trate de especies de ensayo con un número menor de semillas grandes por maceta (réplica), en comparación con las especies de ensayo que permitan utilizar un mayor número de pequeñas semillas por maceta. Plantando un número igual de semillas en cada maceta esta variabilidad puede reducirse al mínimo.

20. Se utilizan grupos de control para garantizar que los efectos observados están asociados con la exposición a la sustancia problema o se atribuyen solo a esta. El grupo de control adecuado debe ser idéntico al grupo de ensayo en todos los aspectos, salvo en la exposición a la sustancia problema. Todas las plantas de un mismo ensayo, incluidas las de los controles, deben proceder de la misma fuente. Para evitar que haya sesgo, es necesario que sea aleatoria la asignación de las macetas de ensayo y de control.

21. Deben evitarse las semillas revestidas de insecticida o fungicida (es decir, las semillas tratadas). Sin embargo, algunas autoridades reguladoras permiten la utilización de determinados fungicidas de contacto no sistémicos (por ejemplo, captano, tiram) (22). Si se teme la presencia de patógenos transmitidos con las semillas, estas pueden bañarse brevemente en una solución de hipoclorito al 5 %, lavarse a continuación abundantemente con agua corriente y secarse. No se autoriza ningún tratamiento curativo con otro producto fitosanitario.

*Condiciones del ensayo*

22. Las condiciones del ensayo deben aproximarse a las condiciones necesarias para el crecimiento normal de las especies y variedades utilizadas (en el apéndice 4 figuran algunos ejemplos de condiciones de ensayo). Las plantas emergentes deben mantenerse con buenas prácticas hortícolas en cámaras de ambiente controlado, invernaderos o fitotrones. Cuando se utilizan instalaciones de cultivo, estas prácticas suelen incluir el control y el registro con una frecuencia adecuada (como, p. ej., cada día) de la temperatura, la humedad, la concentración de dióxido de carbono, la luz (intensidad, longitud de onda, radiación activa para la fotosíntesis) y el fotoperíodo, los medios de riego, etc., para garantizar un buen crecimiento de las plantas, juzgado por el crecimiento de las plantas control de las especies seleccionadas. Conviene controlar la temperatura de los invernaderos mediante sistemas de ventilación, calefacción o refrigeración. Se recomiendan en general las siguientes condiciones para los ensayos en invernaderos:

— temperatura: 22 °C ± 10 °C;

— humedad: 70 % ± 25 %;

— fotoperíodo: mínimo de 16 horas de luz;

— intensidad luminosa: 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$. Puede ser necesario aportar una iluminación adicional si la intensidad desciende por debajo de 200 $\mu E/m^2/s$, longitud de onda de 400 - 700 nm, excepto en caso de determinadas especies cuyas necesidades de luz sean inferiores.

Las condiciones ambientales deben ser objeto de seguimiento y notificación a lo largo de toda la duración del estudio. Las plantas deben cultivarse en macetas no porosas, de plástico o esmaltadas, con una bandeja o platillo

▼M6

debajo de la maceta. Es posible cambiar de posición las macetas periódicamente para minimizar la variabilidad en el crecimiento de las plantas (debida a las diferencias en las condiciones de ensayo en las instalaciones de cultivo). Las macetas deben ser bastante grandes para permitir un crecimiento normal.

23. Pueden añadirse suplementos de nutrientes del suelo según sea necesario para mantener el vigor de las plantas. La necesidad y el calendario de la adición de nutrientes pueden evaluarse mediante la observación de las plantas de control. Se recomienda regar los recipientes de ensayo por el fondo (p. ej., mediante la utilización de mechas de fibra de vidrio). Sin embargo, puede utilizarse el riego superior al principio para estimular la germinación de las semillas y, en caso de aplicación de la sustancia en la superficie del suelo, para facilitar la introducción de la sustancia en el suelo.

24. Las condiciones específicas de cultivo han de ser adecuadas para las especies ensayadas y la sustancia problema estudiada. Las plantas de control y las tratadas deben mantenerse en las mismas condiciones ambientales; no obstante, han de adoptarse medidas adecuadas para impedir la exposición cruzada (p. ej., de sustancias volátiles) entre los distintos grupos de tratamiento, así como la exposición de los controles a la sustancia problema.

*Ensayo a concentración/tasa única*

25. A la hora de determinar la concentración/tasa adecuada de una sustancia para la realización de un ensayo a una concentración/tasa única (ensayo de tolerancia o límite), debe tenerse en cuenta una serie de factores. En relación con las sustancias en general, entre estos factores figuran las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. En el caso de los productos fitosanitarios, hay que considerar las propiedades fisicoquímicas y el régimen de utilización de la sustancia problema, su concentración o tasa de aplicación máxima, el número de aplicaciones por temporada y/o la persistencia de la sustancia problema. Para determinar si una sustancia en general posee propiedades fitotóxicas, puede ser adecuado realizar un ensayo al nivel máximo de 1 000 mg/kg de suelo seco.

*Ensayo de determinación del intervalo*

26. En caso necesario, puede realizarse un ensayo de determinación del intervalo para obtener información sobre las concentraciones o tasas que hayan de someterse a ensayo en el estudio definitivo de la relación dosis-respuesta. Para el ensayo de determinación del intervalo, las concentraciones o tasas de ensayo deben estar muy separadas entre sí (p. ej., 0,1, 1,0, 10, 100 y 1 000 mg/kg de suelo seco). En el caso de los productos fitosanitarios, las concentraciones o tasas podrían basarse en la concentración o tasa de aplicación recomendada o máxima; p, ej., 1/100, 1/10, 1/1 de ese valor.

*Ensayo a concentración/tasa múltiple*

27. El objetivo del ensayo a concentración/tasa múltiple consiste en establecer la relación dosis-respuesta y determinar un valor de $EC_x$ o $ER_x$ relacionada con la emergencia, la biomasa y/o los efectos visibles frente a los controles sin exposición, según exijan las autoridades reguladoras.

28. El número y el espaciado de las concentraciones o tasas deben ser suficientes para generar una relación dosis-respuesta y una ecuación de regresión fiables, y dar una estimación de los valores de $EC_x$ o $ER_x$. Las concentraciones/tasas seleccionadas deben englobar los valores de $EC_x$ o $ER_x$ que haya que determinar. Por ejemplo, si se requiere un valor de $EC_{50}$ sería aconsejable realizar el ensayo a tasas que produzcan un efecto de entre el 20 y el 80 %. El número recomendado de concentraciones/tasas de ensayo para conseguirlo es como mínimo de cinco en una serie geométrica más un control sin tratar, y espaciadas por un factor que no exceda de tres. Respecto

▼M6

a cada grupo de tratamiento y de control el número de réplicas debe ser como mínimo de cuatro y el número total de semillas, al menos de veinte. Puede ser necesario recurrir a más réplicas de determinadas plantas con un índice de germinación bajo o con hábitos de crecimiento variables, para aumentar la potencia estadística del ensayo. Si se utiliza un número mayor de concentraciones/tasas de ensayo, podrá reducirse el número de réplicas. Si ha de estimarse la NOEC, puede ser necesario utilizar más réplicas para obtener la potencia estadística deseada (23).

*Observaciones*

29. Durante el período de observación, es decir, de 14 a 21 días desde el momento en que haya emergido el 50 % de las plantas de control (también del control de disolvente, en su caso), las plantas se examinan con frecuencia (al menos una vez por semana y, en la medida de lo posible, diariamente) para observar la emergencia, así como la fitotoxicidad visible y la mortalidad. Al final del ensayo, deben registrarse la medida del porcentaje de emergencia y la biomasa de las plantas supervivientes, así como los efectos nocivos visibles en diferentes partes de las plantas. Entre estos se incluyen las anomalías del aspecto de las plántulas emergidas, retraso en el crecimiento, clorosis, decoloración, mortalidad y efectos en el desarrollo de las plantas. La biomasa final puede medirse con la media del peso seco final de los brotes de las plantas supervivientes, obtenido recogiendo los brotes desde la superficie del suelo y secándolos, hasta llegar a peso constante, a 60 °C. Otra posibilidad es medir la biomasa final utilizando el peso fresco de los brotes. La altura de los brotes puede ser otro parámetro, si así lo requieren las autoridades reguladoras. Para evaluar las respuestas tóxicas observables, debe utilizarse un sistema uniforme de puntuación de las lesiones visibles. En las referencias (23) y (24) se dan ejemplos para la realización de las evaluaciones visuales cualitativas y cuantitativas.

DATOS E INFORME

**Análisis estadístico**

*Ensayo a concentración/tasa única*

30. Los datos correspondientes a cada especie vegetal deben analizarse mediante un método estadístico adecuado (21). Debe registrarse el nivel del efecto a la concentración/tasa de ensayo, o bien la incapacidad de alcanzar un determinado efecto a la concentración/tasa de ensayo (por ejemplo, $< x$ % de efecto observado a la concentración o tasa $y$).

*Ensayo a concentración/tasa múltiple*

31. Se ha establecido una relación dosis-respuesta en términos de una ecuación de regresión. Pueden utilizarse modelos diferentes: por ejemplo, para estimar la $EC_x$ o $ER_x$ (p. ej., $EC_{25}$, $ER_{25}$, $EC_{50}$, $ER_{50}$) y sus límites de confianza en cuanto a la emergencia, pueden ser apropiados los métodos de datos cuánticos, de logit, de probit, de Weibull, de Spearman-Karber, de Spearman-Karber recortado, etc. En cuanto al crecimiento de las plántulas (peso y altura) como parámetros continuos, pueden estimarse los valores de $EC_x$ o $ER_x$ y sus límites de confianza utilizando un análisis de regresión adecuado [p. ej., el análisis de regresión no lineal de Bruce-Versteeg (25)]. Siempre que sea posible, el valor de $R^2$ debe ser superior o igual a 0,7 para las especies más sensibles, y las concentraciones/tasas de ensayo utilizadas deben englobar los efectos del 20 % al 80 %. Si ha de estimarse la NOEC, debe preferirse la aplicación de ensayos estadísticos potentes y estos deben seleccionarse sobre la base de la distribución de los datos (21) (26).

**Informe del ensayo**

32. El informe del ensayo debe presentar los resultados de los estudios, así como una descripción detallada de las condiciones de ensayo, una discusión exhaustiva de los resultados, el análisis de los datos y las conclusiones extraídas del análisis. Deben presentarse un cuadro sinóptico y un resumen de los resultados. El informe deberá incluir lo siguiente:

▼**M6**

*Sustancia problema:*

— datos de identificación de la sustancia, propiedades pertinentes de la sustancia estudiada (p. ej., log $P_{ow}$, hidrosolubilidad, presión de vapor e información sobre el destino y el comportamiento en el medio ambiente, si se conocen);

— datos sobre la preparación de la solución de ensayo y verificación de las concentraciones de ensayo según se especifica en el punto 18.

*Especies de ensayo:*

— datos sobre el organismo de ensayo: especie/variedad, familia botánica, nombres científico y común, fuente y antecedentes de la semilla lo más detallados posible (es decir, nombre del proveedor, porcentaje de germinación, clase de tamaño de la semilla, número de lote, año o estación de recogida de la semilla, fecha de la determinación del índice de germinación, etc.);

— número de especies de mono y dicotiledóneas utilizadas;

— justificación de la selección de las especies;

— descripción del almacenamiento, tratamiento y conservación de las semillas.

*Condiciones de ensayo:*

— instalaciones de ensayo (por ejemplo, cámara de cultivo, fitotrón e invernadero);

— descripción del sistema de ensayo (por ejemplo, dimensiones y material de las macetas, y cantidades de suelo);

— características del suelo (o el tipo de textura del suelo: granulometría y clasificación del suelo, propiedades físicas y químicas, como el porcentaje de materia orgánica, porcentaje de carbono orgánico y pH);

— preparación del suelo o sustrato (p. ej., suelo, suelo artificial, arena y otros) antes del ensayo;

— descripción del medio nutritivo, en caso de utilizarse;

— aplicación de la sustancia problema: descripción del método de aplicación, descripción del equipo, tasas de exposición y volúmenes, incluida la verificación química, descripción del método de calibración y descripción de las condiciones ambientales durante la aplicación;

— condiciones de cultivo: intensidad luminosa (p. ej., radiación correspondiente a la fotosíntesis), fotoperíodo, temperaturas máxima y mínima, régimen y método de riego, fertilización;

— número de semillas por maceta, número de plantas por dosis, número de réplicas (macetas) por tasa de exposición;

— tipo y número de controles (controles positivos y/o negativos, control de disolvente en su caso);

— duración del ensayo.

*Resultados:*

— cuadro de todos los parámetros correspondientes a cada réplica, concentración/tasa de ensayo y especie;

— número y porcentaje de emergencias en comparación con los controles;

— mediciones de la biomasa (peso seco o peso fresco de los brotes) de las plantas como porcentaje de la de los controles;

▼M6

— altura de los brotes como porcentaje de la de los controles, si se ha medido;

— porcentaje de las lesiones visibles y descripción cuali y cuantitativa de las lesiones visibles (clorosis, necrosis, marchitamiento, deformación de hojas y tallos, así como eventual ausencia de efectos) causadas por la sustancia problema en comparación con las plantas de control;

— descripción de la escala de clasificación utilizada para evaluar las lesiones visibles, si se facilita una clasificación visual;

— en caso de estudios a tasa única, debe indicarse el porcentaje de lesiones;

— valores de $EC_x$ o $ER_x$ (p. ej., $EC_{50}$, $ER_{50}$, $EC_{25}$, $ER_{25}$) y límites de confianza correspondientes; cuando se hace un análisis de regresión, debe aportarse el error típico de la ecuación de regresión, y el error típico de la estimación de los parámetros individuales (p. ej., pendiente, ordenada en el origen);

— valores de LOEC y NOEC si se calculan;

— descripción de los procedimientos estadísticos y de las hipótesis utilizadas;

— representación gráfica de dichos datos y de la relación dosis-respuesta de las especies estudiadas;

desviaciones de los procedimientos descritos en el presente método de ensayo y de cualquier acontecimiento inusual ocurrido en el ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Schrader G., Metge K. and Bahadir M. (1998). Importance of salt ions in ecotoxicological tests with soil arthropods. Applied Soil Ecology, 7, 189-193.

(2) Organización Internacional de Normalización (1993). ISO 11269-1. Calidad del suelo. Determinación de los efectos de los contaminantes sobre la flora del suelo. Parte 1: Método para la medida de la inhibición del crecimiento radicular.

(3) Organización Internacional de Normalización (1995). ISO 11269-2. Calidad del suelo. Determinación de los efectos de los contaminantes sobre la flora del suelo. Parte 2: Efectos de los suelos contaminados sobre la emergencia y el crecimiento temprano de las plantas superiores.

(4) American Standard for Testing Material (ASTM) (2002). E 1963-98. Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.

(5) U.S. EPA (1982). FIFRA, 40CFR, Part 158.540. Subdivision J, Parts 122-1 and 123-1.

(6) US EPA (1996). OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 850. Ecological Effects Test Guidelines:

— 850.4000: Background — Non-target Plant Testing;

— 850.4025: Target Area Phytotoxicity;

— 850.4100: Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence);

— 850.4200: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test;

— 850.4225: Seedling Emergence, Tier II;

— 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.

(7) AFNOR, X31-201 (1982). Essai d'inhibition de la germination de semences par une substance. AFNOR X31-203/ISO 11269-1 (1993) Détermination des effets des polluants sur la flore du sol: Méthode de mesurage de l'inhibition de la croissance des racines.

(8) Boutin, C., Freemark, K.E. and Keddy, C.J. (1993). Proposed guidelines for registration of chemical pesticides: Non-target plant testing and evaluation. Technical Report Series No.145. Canadian Wildlife Service (Headquarters), Environment Canada, Hull, Québec, Canada.

▼**M6**

(9) Forster, R., Heimbach, U., Kula, C. and Zwerger, P. (1997). Effects of Plant Protection Products on Non-Target Organisms — A contribution to the Discussion of Risk Assessment and Risk Mitigation for Terrestrial Non-Target Organisms (Flora and Fauna). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. No 48.

(10) Hale, B., Hall, J.C., Solomon, K. and Stephenson, G. (1994). A Critical Review of the Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides; Non-Target Plant Testing and Evaluation, Centre for Toxicology, University of Guelph, Ontario Canada.

(11) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) y Soil Sc. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(12) Audus, L.J. (1964). Herbicide behaviour in the soil. In: Audus, L.J. ed. *The Physiology and biochemistry of Herbicides*, Londres, Nueva York, Academic Press, NY, Chapter 5, pp. 163-206.

(13) Beall, M.L., Jr. and Nash, R.G. (1969). Crop seedling uptake of DDT, dieldrin, endrin, and heptachlor from soil, J. Agro. 61:571-575.

(14) Beetsman, G.D., Kenney, D.R. and Chesters, G. (1969). Dieldrin uptake by corn as affected by soil properties, J. Agro. 61:247-250.

(15) U.S. Food and Drug Administration (FDA) (1987). Environmental Assessment Technical Handbook. Environmental Assessment Technical Assistance Document 4.07, Seedling Growth, 14 pp., FDA, Washington, DC.

(16) McKelvey, R.A., Wright, J.P., Honegger, J.L. and Warren, L.W. (2002). A Comparison of Crop and Non-crop Plants as Sensitive Indicator Species for Regulatory Testing. Pest Management Science vol. 58:1161-1174

(17) Boutin, C.; Elmegaard, N. and Kjær, C. (2004). Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: Implications for risk assessment. Ecotoxicology vol. 13(4): 349-369.

(18) Boutin, C. and Rogers, C.A. (2000). Patterns of sensitivity of plant species to various herbicides — An analysis with two databases. Ecotoxicology vol. 9(4):255-271.

(19) Boutin, C. and Harper, J.L. (1991). A comparative study of the population dynamics of five species of *Veronica* in natural habitats. J. Ecol. 9:155-271.

(20) Boutin, C., Lee, H.-B., Peart, T.E., Batchelor, S.P. and Maguire, R.J. (2000). Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Envir. Toxicol. Chem. 19 (10): 2532-2541.

(21) OCDE (2006). Draft Guidance Document, Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No 54, Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, París.

(22) Hatzios, K.K. and Penner, D. (1985). Interactions of herbicides with other agrochemicals in higher plants. Rev. Weed Sci. 1:1-63.

(23) Hamill, P.B., Marriage, P.B. and G. Friesen (1977). A method for assessing herbicide performance in small plot experiments. Weed Science 25:386-389.

(24) Frans, R.E. and Talbert, R.E. (1992). Design of field experiments and the measurement and analysis of plant response. In: B. Truelove (Ed.) Research Methods in Weed Science, 2nd ed. Southern weed Science Society, Auburn, 15-23.

(25) Bruce, R.D. and Versteeg, D. J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11, 1485-1492.

(26) Capítulo C.33 del presente anexo: Ensayo de reproducción de lombrices de tierra (*Eisenia fetida* / *Eisenia andrei*).

▼M6

*Apéndice 1*

**Definiciones**

**Principio activo (p.a.) [o sustancia activa (s.a.)]**: material diseñado para proporcionar un efecto biológico específico (por ejemplo, lucha contra los insectos, lucha contra enfermedades vegetales, lucha contra las malas hierbas en la zona de tratamiento), también conocido como principio activo o sustancia activa de grado técnico.

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**Productos fitosanitarios (PFS) o plaguicidas**: materiales con una determinada actividad biológica que se utilizan intencionadamente para proteger los cultivos contra las plagas (p. ej., contra enfermedades fúngicas, insectos, y plantas competitivas).

**$EC_x$, concentración con efecto al x %, o $ER_x$, tasa con efecto al x %**: concentración o tasa que provoca un cambio o alteración indeseable del x % en el parámetro de ensayo que se mide, en relación con el control (p. ej., una reducción del 25 % o 50 % en la emergencia de las plántulas, en el peso de los brotes, en el número final de plantas presentes, o un aumento de las lesiones visibles en esos porcentajes se corresponderían con una $EC_{25}/ER_{25}$ o $EC_{50}/ER_{50}$ respectivamente).

**Emergencia**: aparición del coleóptilo o cotiledón por encima de la superficie del suelo.

**Formulación**: producto formulado comercial que contiene la sustancia activa (principio activo), también conocido como preparado final ([1]) o producto típico de uso final.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: concentración más baja de la sustancia problema a la que se observa un efecto. En este ensayo, la concentración correspondiente a la LOEC tiene un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro de un determinado período de exposición en comparación con el control, y es superior al valor de NOEC.

**Plantas no diana**: plantas que se encuentran fuera de la zona de las plantas diana. En el caso de los productos fitosanitarios, esta denominación se refiere en general a las plantas que se encuentran fuera de la zona de tratamiento.

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: concentración más elevada de la sustancia problema a la que no se observa ningún efecto. En este ensayo, la concentración correspondiente a la NOEC no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro de un determinado período de exposición en comparación con el control.

**Fitotoxicidad**: desviaciones perjudiciales (detectadas por medición y por evaluación visual) respecto al modelo normal de aspecto y de crecimiento de las plantas, en respuesta a una sustancia determinada.

**Réplica**: unidad experimental que representa al grupo de control o al grupo de tratamiento. En estos estudios, la maceta se define como la réplica.

**Evaluación visual**: calificación de las lesiones visibles según las observaciones del porte, vigor, malformaciones, clorosis, necrosis y aspecto general de las plantas, en comparación con un control.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

([1]) Preparado final: producto formulado vendido en el comercio que contiene la sustancia activa (principio activo).

▼**M6**

*Apéndice 2*

**Lista de especies utilizadas tradicionalmente en el ensayo de plantas**

| Familia | Especie | Denominación común |
|---|---|---|
| *DICOTYLEDONAE* | | |
| Apiaceae (Umbelliferae) | *Daucus carota* | Zanahoria |
| Asteraceae (Compositae) | *Helianthus annuus* | Girasol |
| Asteraceae (Compositae) | *Lactuca sativa* | Lechuga |
| Brassicaceae (Cruciferae) | *Sinapis alba* | Mostaza blanca |
| Brassicaceae (Cruciferae) | *Brassica campestris,* var. *chinensis* | Col de China |
| Brassicaceae (Cruciferae) | *Brassica napus* | Colza |
| Brassicaceae (Cruciferae) | *Brassica oleracea* var. *capitata* | Col |
| Brassicaceae (Cruciferae) | *Brassica rapa* | Nabo |
| Brassicaceae (Cruciferae) | *Lepidium sativum* | Mastuerzo |
| Brassicaceae (Cruciferae) | *Raphanus sativus* | Rábano |
| Chenopodiaceae | *Beta vulgaris* | Remolacha azucarera |
| Cucurbitaceae | *Cucumis sativus* | Pepino |
| Fabaceae (Leguminosae) | *Glycine max (G. soja)* | Soja |
| Fabaceae (Leguminosae) | *Phaseolus aureus* | Judía mung |
| Fabaceae (Leguminosae) | *Phaseolus vulgaris* | Judía enana, alubia, habichuela |
| Fabaceae (Leguminosae) | *Pisum sativum* | Guisante |
| Fabaceae (Leguminosae) | *Trigonella foenum-graecum* | Fenogreco |
| Fabaceae (Leguminosae) | *Lotus corniculatus* | Loto de los prados |
| Fabaceae (Leguminosae) | *Trifolium pratense* | Trébol violeta |
| Fabaceae (Leguminosae) | *Vicia sativa* | Veza |
| Linaceae | *Linum usitatissimum* | Lino |
| Polygonaceae | *Fagopyrum esculentum* | Alforfón |
| Solanaceae | *Solanum lycopersicum* | Tomate |

▼**M6**

| Familia | Especie | Denominación común |
|---|---|---|
| *MONOCOTYLEDONAE* | | |
| Liliaceae (Amaryllada-ceae) | *Allium cepa* | Cebolla |
| Poaceae (Gramineae) | *Avena sativa* | Avena |
| Poaceae (Gramineae) | *Hordeum vulgare* | Cebada |
| Poaceae (Gramineae) | *Lolium perenne* | Ballico |
| Poaceae (Gramineae) | *Oryza sativa* | Arroz |
| Poaceae (Gramineae) | *Secale cereale* | Centeno |
| Poaceae (Gramineae) | *Sorghum bicolor* | Sorgo de grano, caña dulce |
| Poaceae (Gramineae) | *Triticum aestivum* | Trigo |
| Poaceae (Gramineae) | *Zea mays* | Maíz |

▼M6

*Apéndice 3*

**Lista de posibles especies no cultivadas**

**Posibles especies según la OCDE para los ensayos de toxicidad con plantas**

*Nota:* El cuadro siguiente ofrece información sobre 52 especies no cultivadas (las referencias para cada entrada figuran entre paréntesis). Las tasas de emergencia indicadas son datos publicados en la bibliografía, y solo tienen valor orientativo general. La experiencia individual puede variar en función del origen de las semillas y de otros factores.

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida [1] y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento [2] | Profundidad de la plantación (mm) [3] | Tiempo para la germinación (días) [4] | Tratamientos especiales [5] | Ensayo de toxicidad [6] | Proveedores de las semillas [7] | Otras referencias [8] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **APIACEAE**<br>*Torilis japonica*<br>(cachurro) | A, B Zonas alteradas, setos, pastizales (16, 19) | 1,7 - 1,9 (14, 19) | L = D (14) | 0 (1, 19) | 5 (50 %) (19) | Estratificación en frío (7, 14, 18, 19) Puede ser necesaria una fase de maduración (19) Germinación inhibida por la oscuridad (1, 19) Sin tratamientos especiales (5) | POST (5) | | |
| **ASTERACEAE**<br>*Bellis perennis*<br>(margarita) | P<br>Pastos, tierras de labor, turba (16, 19) | 0,09 - 0,17 (4, 19) | L = D (14) | 0 (4) | 3 (50 %) (19)<br>11 (100 %) (18) | Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (18, 19) Sin tratamientos especiales (4, 14) | POST (4) | A, D, F | 7 |
| *Centaurea cyanus*<br>(aciano) | A<br>Campos, cunetas, hábitats abiertos (16) | 4,1 - 4,9 (4, 14) | L = D (14) | 0 - 3 (2, 4, 14) | 14 - 21 (100 %) (14) | Sin tratamientos especiales (2, 4) | POST (2, 4) | A, D, E, F | 7 |
| *Centaurea nigra*<br>(aciano negro) | P<br>Campos, cunetas, hábitats abiertos (16, 19) | 2,4 - 2,6 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 3 (50 %) (19)<br>4 (97 %) (18) | Puede ser necesaria una fase de maduración (18, 19) Germinación inhibida por la oscuridad (19) Sin tratamientos especiales (5, 14, 26) | POST (5, 22, 26) | A | |
| *Inula helenium*<br>(helenio) | P<br>Lugares húmedos, alterados (16) | 1 - 1,3 (4, 14, 29) | | 0 (4, 29) | | Sin tratamientos especiales (4) | POST (4) | A, F | |

02008R0440 — ES — 16.10.2019 — 008.001 — 2040

▼M6

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida ([1]) y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento ([2]) | Profundidad de la plantación (mm) ([3]) | Tiempo para la germinación (días) ([4]) | Tratamientos especiales ([5]) | Ensayo de toxicidad ([6]) | Proveedores de las semillas ([7]) | Otras referencias ([8]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Leontodon hispidus* (diente de león hirsuto) | P Campos, cunetas, zonas alteradas (16, 19) | 0,85 - 1,2 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 4 (50 %) (19) 7 (80 %) (18) | Germinación inhibida por la oscuridad (17, 18, 19) Sin tratamientos especiales (5, 23) | POST (5, 22, 23) | | |
| *Rudbeckia hirta* (rudbeckia velluda) | B, P Zonas alteradas (16) | 0,3 (4, 14) | L = D (14) | 0 (4, 33) | < 10 (100 %) (33) | Sin tratamientos especiales (4, 14, 33) | POST (4, 33) | C, D, E, F | |
| *Solidago canadensis* (vara de oro canadiense) | P Pastizales, zonas abiertas (16) | 0,06 -0,08 (4, 14) | L = D (11) | 0 (4) | 14 - 21 (11) | Mezclar con la misma cantidad de arena y empapar en GA de 500 ppm durante 24 horas (11) Sin tratamientos especiales (4) | POST (4) | E, F | |
| *Xanthium pensylvanicum* (abrojo) | A Campos, hábitats abiertos (16) | 25 - 61 (14, 29) | | 0 (1) 5 (29) | | La germinación puede verse inhibida por la oscuridad (1) Bañar en agua caliente durante 12 horas (29) | PRE Y POST (31) | A | |
| *Xanthium spinosum* (abrojillo) | A Hábitats abiertos (16) | 200 (14) | L = D (14) L > D (6) | 10 (6) | | Escarificación (14) Sin tratamientos especiales (6) | PRE Y POST (6) | A | |
| *Xanthium strumarium* (bardana) | A Campos, hábitats abiertos (16) | 67,4 (14) | L = D (14) | 10 - 20 (6, 21) | | Sin tratamientos especiales (6, 14, 21) | PRE Y POST (6, 21, 28, 31) | A | |
| **BRASSICACEAE** *Cardamine pratensis* (berro de prado) | P Campos, cunetas, turba (16, 19) | 0,6 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 5 (50 %) (19) 15 (98 %) (18) | Germinación inhibida por la oscuridad (8, 19) Sin tratamientos especiales (5, 14, 22) | POST (5, 22) | F | |

▼M6

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida ([1]) y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento ([2]) | Profundidad de la plantación (mm) ([3]) | Tiempo para la germinación (días) ([4]) | Tratamientos especiales ([5]) | Ensayo de toxicidad ([6]) | Proveedores de las semillas ([7]) | Otras referencias ([8]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **CARYOPHYLLACEAE**<br>*Lychnis flos-cuculi*<br>(flor de cuclillo) | P<br>(16) | 0,21 (14) | L = D (14) | | < 14 (100 %)<br>(14, 25) | Puede ser necesaria una fase de maduración (18) Sin tratamientos especiales (5, 14, 15, 22 - 26) | POST (5, 15, 22 - 26) | F | |
| **CHENOPODIACEAE**<br>*Chenopodium album*<br>(cenizo) | A<br>Lindes de campos, zonas alteradas (16, 19) | 0,7 - 1,5<br>(14, 19, 34) | L = D (14) | 0<br>(1, 19) | 2 (50 %) (19) | El tratamiento depende del color de la semilla (19) Dormancia en almacenamiento seco (19) Germinación inhibida por la oscuridad (1, 18, 19) Estratificación en frío (18) Sin tratamiento especial (14, 34) | PRE Y POST<br>(28, 31, 34) | A | 32 |
| **CLUSIACEAE**<br>*Hypericum perforatum*<br>(hipérico) | P<br>Campos, tierras de labor, hábitats abiertos (16, 19) | 0,1 - 0,23<br>(14, 19) | L = D<br>(14) | 0<br>(1, 19) | 3 (19)<br>11 (90 %) (18) | Germinación inhibida por la oscuridad (1, 18, 19)<br>Sin tratamientos especiales (5, 14, 15, 25, 27) | POST<br>(5, 15, 25, 27) | A, E, F | |
| **CONVOLVULACEAE**<br>*Ipomoea hederacea*<br>(trompillo) | A<br>Cunetas, hábitats abiertos, campos de maíz (16) | 28,2<br>(14) | L > D<br>(6, 10) | 10 - 20<br>(6, 10, 21) | 4 (100 %)<br>(10) | Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (1)<br>Sin tratamientos especiales (6, 21) | PRE Y POST<br>(6, 12, 21, 28) | A | |
| **CYPERACEAE**<br>*Cyperus rotundus*<br>(coquito) | P<br>Tierras de labor, pastizales, cunetas (16, 30) | 0,2<br>(14) | L = D<br>(14) | 0 (1)<br>10 - 20 (6, 10) | 12 (91 %)<br>(10) | Germinación inhibida por la oscuridad (1)<br>Sin tratamientos especiales (6, 10, 14) | PRE Y POST<br>(6, 28, 31) | B | 7 |
| **FABACEAE**<br>*Lotus corniculatus*<br>(cuernecillo) | P<br>Herbazales, cunetas, hábitats abiertos (16, 19) | 1 - 1,67<br>(14, 19) | L = D (14) | | 1 (50 %)<br>(19) | Escarificación (14, 19)<br>Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (18, 19) Sin tratamientos especiales (23, 25) | POST<br>(5, 23, 25) | A, D, E, F | |

▼M6

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida ([1]) y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento ([2]) | Profundidad de la plantación (mm) ([3]) | Tiempo para la germinación (días) ([4]) | Tratamientos especiales ([5]) | Ensayo de toxicidad ([6]) | Proveedores de las semillas ([7]) | Otras referencias ([8]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Senna obtusifolia* (hediondillo) | A Bosques húmedos (16) | 23 - 28 (9) | L = D (14) L > D (9) | 10 - 20 (6, 9) | | Bañar las semillas en agua durante 24 horas (9) Escarificación (14) La viabilidad de las semillas depende del color (1) Sin tratamientos especiales (6) | POST (6, 9) | A | |
| *Sesbania exaltata* (cáñamo) | A Suelos aluviales (16) | 11 - 13 (9, 14) | L > D (9) | 10 - 20 (9, 21) | | Bañar las semillas en agua durante 24 horas (9) Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (18, 1) Sin tratamientos especiales (21) | PRE Y POST (9, 21, 28, 31) | A | |
| *Trifolium pratense* (trébol rojo) | P Campos, cunetas, tierras de labor (16, 19) | 1,4 - 1,7 (14, 19) | L = D (14) | | 1 (50 %) (19) | Escarificación (14, 18) Puede ser necesaria una fase de maduración (19) Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (1, 19) Sin tratamientos especiales (5) | POST (5) | A, E, F | |
| **LAMIACEAE** *Leonurus cardiaca* (agripalma) | P Zonas abiertas (16) | 0,75 - 1,0 (4, 14) | L = D (14) | 0 (4) | | Sin tratamientos especiales (4, 14) | POST (4) | F | |
| *Mentha spicata* (hierbabuena) | P Zonas húmedas (16) | 2,21 (4) | | 0 (4) | | Sin tratamientos especiales (4) | POST (4) | F | |
| *Nepeta cataria* (hierba gatera) | P Zonas alteradas (16) | 0,54 (4, 14) | L = D (14) | 0 (4) | | Sin tratamientos especiales (2, 4, 14) | POST (2, 4) | F | |

▼M6

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida [1] y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento [2] | Profundidad de la plantación (mm) [3] | Tiempo para la germinación (días) [4] | Tratamientos especiales [5] | Ensayo de toxicidad [6] | Proveedores de las semillas [7] | Otras referencias [8] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Prunella vulgaris* (consuelda menor) | P Tierras de labor, herbazales, lugares alterados (16, 19) | 0,58 -1,2 (4, 14, 19) | L = D (14) | 0 (4, 19) | 5 (50 %) (19) 7 (91 %) (18) | Germinación inhibida por la oscuridad (18, 19) Germinación mejor con semillas mayores (1) Sin tratamientos especiales (4, 14, 22) | POST (4, 22) | A, F | |
| *Stachys officinalis* (betónica) | P Prados, lindes de campos (19) | 14 - 18 (14, 19) | L = D (14) | | 7 (50 %) (19) | Sin tratamientos especiales (5, 14, 22) | POST (5, 22) | F | |
| **MALVACEAE** *Abutilon theophrasti* (abutilón) | A Campos, hábitats abiertos (16) | 8,8 (14) | L = D (14) | 10 - 20 (6, 10, 21) | 4 (84 %) (10) | Escarificación (14) Sin tratamientos especiales (5, 10, 21) | PRE Y POST (6, 22, 28, 31) | A, F | |
| *Sida spinosa* (malva de caballo) | A Campos, cunetas (16) | 3,8 (14) | L = D (14) | 10 - 20 (6, 21) | | Escarificación (14) Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (1) Sin tratamientos especiales (6, 21) | PRE Y POST (6, 21, 28, 31) | A, F | |
| **PAPAVERACEAE** *Papaver rhoeas* (amapola) | A Campos, tierras de labor, lugares alterados (16, 19) | 0,1 - 0,3 (4, 14, 19, 29) | L = D (14) | 0 (4, 29) | 4 (50 %) (19) | Estratificación en frío y escarificación (1, 19, 32) Sin tratamientos especiales (4, 14, 29) | POST (4) | A, D, E, F, G | |
| **POACEAE** *Agrostis tenuis* (agróstide común) | Céspedes, pastizales (16) | 0,07 (14) | L > D (IO) | 20 (10) | 10 (62 %) (10) | Germinación inhibida por la oscuridad (1, 17 - 19) Sin tratamientos especiales (10) | POST (10) | A, E | |
| *Alopecurus myosuroides* (cola de zorra) | A Campos, hábitats abiertos (16) | 0,9 - 1,6 (29, 34) | L = D (14) | 2 (29) | < 24 (30 %) (34) | Escarificación (14) Tratar con 101 mg/l $KNO_3$ (14) Estratificación en caliente (1) Germinación inhibida por la oscuridad (1) Sin tratamientos especiales (34) | PRE Y POST (28, 34) | A | 32 |

▼M6

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida [1] y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento [2] | Profundidad de la plantación (mm) [3] | Tiempo para la germinación (días) [4] | Tratamientos especiales [5] | Ensayo de toxicidad [6] | Proveedores de las semillas [7] | Otras referencias [8] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Avena fatua* (ballueca) | A Zonas cultivadas, hábitats abiertos (16) | 7 - 37,5 (14, 30) | L = D (14) L > D (6) | 10 - 20 (6, 10) | 3 (70 %) (18) | Escarificación (7, 32) Germinación inhibida por la oscuridad (1) Estratificación en frío (1, 18) Sin tratamientos especiales (6, 10, 14) | PRE Y POST (6, 10, 28, 31) | A | |
| *Bromus tectorum* (espiguilla colgante) | A Campos, cunetas, tierras de labor (16) | 0,45 - 2,28 (14, 29) | L = D (14) | 3 (29) | | Período de maduración (1, 7, 32) Germinación inhibida por la oscuridad (1) Sin tratamientos especiales (14) | PRE Y POST (28, 31) | A | |
| *Cynosurus cristatus* (cola de perro) | P Campos, cunetas, hábitats abiertos (16, 19) | 0,5 - 0,7 (14, 19, 29) | L = D (14) | 0 (29) | 3 (50 %) (19) | Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (19) Sin tratamientos especiales (14, 29) | POST (5) | A | |
| *Digitaria sanguinalis* (garranchuela) | A Campos, turba, hábitats abiertos (16) | 0,52 - 0,6 (14, 30) | L = D (14) | 10 - 20 (21) | 7 (75 %) 14 (94 %) (7) | Escarificación, estratificación en frío y maduración (1, 7, 14, 32) Tratar con 101 mg/l $KNO_3$ (14) Germinación inhibida por la oscuridad (1) Sin tratamientos especiales (21) | PRE Y POST (18, 25, 31) | A | |
| *Echinochloa crusgalli* (mijera) | A (16) | 1,5 (14) | L = D (14) L > D (3) | 10 - 20 (7, 21) | | Escarificación (7, 32) Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (1) Sin tratamientos especiales (3, 14, 21) | PRE Y POST (3, 21, 28, 31) | A | |
| *Elymus canadensis* (zacate silvestre de Canadá) | P Lugares ribereños, alterados (16) | 4 - 5 (14, 30) | L = D (11) | 1 (11) | 14 - 28 (11) | Sin tratamientos especiales (2, 11) | POST (2) | C, D, E | |
| *Festuca pratensis* (cañuela) | P Campos, zonas húmedas (16, 19) | 1,53 - 2,2 (16, 19) | L = D (14) L > D (10) | 20 (10) | 9 (74 %) (10) 2 (50 %) (19) | Sin tratamientos especiales (10, 19) | POST (10) | A | 7 |

▼M6

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida ([1]) y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento ([2]) | Profundidad de la plantación (mm) ([3]) | Tiempo para la germinación (días) ([4]) | Tratamientos especiales ([5]) | Ensayo de toxicidad ([6]) | Proveedores de las semillas ([7]) | Otras referencias ([8]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Hordeum pusillum* (cola de zorro) | A Pastizales, cunetas, hábitats abiertos (16) | 3,28 (14) | | | | Estratificación en caliente (1) Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (1) | PRE (31) | | 7 |
| *Phleum pratense* (fleo de los prados) | P Pastizales, tierras de labor, lugares alterados (16, 19) | 0,45 (14, 19) | L > D (10, 14) | 0 - 10 (10, 19) | 2 (74 %) (10) 8 (50 %) (19) | Germinación inhibida por la oscuridad (19) Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (17) Sin tratamientos especiales (10, 14, 17, 19) | POST (10) | A, E | |
| **POLYGONACEAE** *Polygonum convolvulus* (polígono trepador) | A Hábitats abiertos, cunetas (16) | 5 - 8 (4, 14, 29) | L = D (20) | 0 - 2 (4, 29) | | Estratificación en frío durante 4-8 semanas (1, 2, 4, 20, 29) Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (1) | PRE Y POST (1, 2, 20, 28, 31) | A | 32 |
| *Polygonum lapathifolium* (hierba pejiguera) | A Suelos húmedos (16) | 1,8 - 2,5 (14) | L > D (6) | | 5 (94 %) (18) | Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (1) Germinación inhibida por la oscuridad (18) Estratificación en frío (1) Sin tratamientos especiales (5) | PRE Y POST (6) | A, E | |
| *Polygonum pennsylvanicum* (polígono de Pennsylvania) | A Campos, hábitats abiertos (16) | 3,6 - 7 (14, 29) | | 2 (29) | | Estratificación en frío durante 4 semanas a 0 - 5 °C (1, 29) Germinación inhibida por la oscuridad (1) | PRE (31) | A, E | |
| *Polygonum persicaria* (persicaria) | A Zonas alteradas, tierras de labor (16, 19) | 2,1 - 2,3 (14, 19) | L > D (13) | 0 (19) | < 14 (13) 2 (50 %) (19) | Escarificación, estratificación en frío, tratamiento con GA (14) Estratificación en frío, maduración (17 - 19) Germinación inhibida por la oscuridad (19) Sin tratamientos especiales (13) | POST (13) | A | 32 |

▼M6

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida ([1]) y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento ([2]) | Profundidad de la plantación (mm) ([3]) | Tiempo para la germinación (días) ([4]) | Tratamientos especiales ([5]) | Ensayo de toxicidad ([6]) | Proveedores de las semillas ([7]) | Otras referencias ([8]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Rumex crispus* (acedera) | P Tierras de labor, cunetas, zonas abiertas (16, 19) | 1,3 - 1,5 (4, 14, 19) | L = D (14, 33) | 0 (4, 19, 33) | 3 (50 %) (19) 6 (100 %) (33) | Germinación inhibida por la oscuridad (18, 19) Puede ser necesaria una fase de maduración (18) Sin tratamientos especiales (4, 14, 33) | POST (4, 33) | A, E | 32 |
| **PRIMULACEAE** *Anagallis arvensis* (anagálide) | A Tierras de labor, herbazales, lugares alterados (16, 19) | 0,4 - 0,5 (4, 14, 19) | L = D (14) | | 1 (50 %) (19) | Estratificación en frío, tratamiento con GA (1,14, 18, 19, 32) Luz necesaria para la germinación (1) Sin tratamientos especiales (2, 4) | POST (2,4) | A, F | |
| **RANUNCULACEAE** *Ranunculus acris* (botón de oro) | P Tierras de labor, cunetas, zonas abiertas (16, 19) | 1,5 - 2 (14, 19, 29) | L = D (14) | 1 (29) | 41 - 56 (19, 29) | Sin tratamientos especiales (5, 14, 22, 24 - 26) | POST (5, 22, 24 - 26) | | 32 |
| **ROSACEAE** *Geum urbanum* (hierba de San Benito) | P Setos, zonas húmedas (16, 19) | 0,8 - 1,5 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 5 (50 %) (19) 16 (79 %) (18) | Germinación inhibida por la oscuridad (18, 19) Estratificación en caliente (1) Sin tratamientos especiales (5, 14, 22, 25, 26) | POST (5, 22, 25, 26) | A | |
| **RUBIACEAE** *Galium aparine* (amor de hortelano) | A Tierras de labor, zonas húmedas, lugares alterados (16, 19) | 7 - 9 (14, 19) | L = D (14) | | 5 (50 %) (19) 6 (100 %) (18) | Estratificación en frío (1, 18, 19) Germinación no afectada por la intensidad de la radiación (18, 19) La luz inhibe la germinación (1) Sin tratamientos especiales (6, 14) | PRE Y POST (6, 28) | A | 32 |

▼M6

| FAMILIA Nombre botánico de la especie (nombre común en español) | Duración de vida ([1]) y hábitat | Peso de la semilla (mg) | Fotoperíodo para la germinación o el crecimiento ([2]) | Profundidad de la plantación (mm) ([3]) | Tiempo para la germinación (días) ([4]) | Tratamientos especiales ([5]) | Ensayo de toxicidad ([6]) | Proveedores de las semillas ([7]) | Otras referencias ([8]) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Galium mollugo* (galio blanco) | P Setos en taludes, zonas abiertas (8) | 7 (29) | L = D (14) | 2 (29) | | Sin tratamientos especiales (5, 14, 22, 24, 26, 29) | POST (5, 22, 24, 26) | A | |
| **SCROPHULARIACEAE** *Digitalis purpurea* (digital) | P, B Setos, zonas abiertas (16, 19) | 0,1 - 0,6 (4, 14, 19) | L = D (14) | 0 (4, 19) | 6 (50 %) (19) 8 (99 %) (18) | Germinación inhibida por la oscuridad (1, 17, – 19) Sin tratamientos especiales (4, 22 - 26) | POST (4, 22 - 26) | D, G, F | |
| *Veronica persica* (verónica) | A Tierras de labor, zonas abiertas, lugares alterados (16, 19) | 0,5 - 0,6 (14, 19) | L = D (14) | 0 (19) | 3 (19) 5 (96 %) (18) | Germinación inhibida por la oscuridad (18, 19) Estratificación en frío (18) Sin tratamientos especiales (14) | PRE Y POST (28) | A | 32 |

([1]) A = anuales, B = bienales, P = perennes.
([2]) Las referencias 11, 14 y 33 aluden a la proporción de luz (L) y oscuridad (D) necesaria para inducir la germinación de las semillas. Las referencias 3, 6, 9, 10, 13 y 20 aluden a las condiciones de cultivo en invernaderos.
([3]) 0 mm indica que las semillas se siembran en la superficie del suelo o que necesitan luz para germinar.
([4]) Las cifras indicadas corresponden al número de días en que ha germinado un porcentaje de semillas según la referencia señalada como, por ejemplo, germinación del 50 % en 3 días (referencia 19).
([5]) No se dispone en todos los casos de la duración de la fase de maduración o de estratificación. Excepto en el caso de requisitos de tratamiento en frío, no se especifican las condiciones de temperatura, ya que en el ensayo en invernadero hay un control limitado de la temperatura. La mayor parte de las semillas germinan en las condiciones normales de fluctuación de la temperaturas de los invernaderos.
([6]) Aquí se indica si la especie se ha utilizado en un ensayo de fitotoxicidad con herbicidas previo a la emergencia (PRE) o posterior a esta (POST).
([7]) Se indican ejemplos de proveedores comerciales de semillas.
([8]) Se indican otras referencias consultadas.

▼M6

**Proveedores de semillas citados**

| Identidad del proveedor | Información del proveedor |
|---|---|
| A | Herbiseed<br>New Farm, Mire Lane, West End, Twyford RG10 0NJ Reino Unido + 44 (0) 1189 349 464<br>www.herbiseed.com |
| B | Tropilab Inc.<br>8240 Ulmerton Road, Largo, FL 33771-3948 Estados Unidos (727) 344 - 4050<br>www.tropilab.com |
| C | Pterophylla — Native Plants & Seeds<br>#316 Regional Road 60, RR#1, Walsingham, ON N0E 1X0 Canadá (519) 586 — 3985 |
| D | Applewood Seed Co.<br>5380 Vivian St., Arvada, CO 80002 Estados Unidos (303) 431 - 7333<br>www.applewoodseed.com |
| E | Ernst Conservation Seeds<br>9006 Mercer Pike, Meadville, PA 16335 Estados Unidos (800) 873 - 3321<br>www.ernstseed.com |
| F | Chiltern Seeds<br>Bortree Stile, Ulverston, Cumbria LA12 7PB Reino Unido + 44 1229 581137<br>www.chiltemseeds.co.uk |
| G | Thompson & Morgan<br>P.O. Box 1051, Fort Erie, ON L2A 6C7 Canadá<br>(800) 274 - 7333<br>www.thompson-morgan.com |

REFERENCIAS CITADAS:

(1) Baskin, C.C. & Baskin, J.M. 1998. Seeds. Academic Press, Toronto.

(2) Blackburn, L.G. & Boutin, C. 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Round-Up®). Ecotoxicology, 12:271-285.

(3) Boutin, C., Lee, H-B., Peart, T., Batchelor, P.S., & Maguire, R.J. 2000. Effects of the sulfonylurea herbicide metsulfuron methyl on growth and reproduction of five wetland and terrestrial plant species. Environmental Toxicology & Chemistry, 19(10):2532-2541.

(4) Boutin, C., Elmegaard, N., & Kjaer, C. 2004. Toxicity testing of fifteen non-crop plant species with six herbicides in a greenhouse experiment: implications for risk assessment. Ecotoxicology, 13:349-369.

(5) Breeze, V., Thomas, G., & Butler, R. 1992. Use of a model and toxicity data to predict the risks to some wild plant species from drift of four herbicides. Annals of Applied Biology, 121:669-677.

(6) Brown, R.A., & Farmer, D. 1991. Track-sprayer and glasshouse techniques for terrestrial plant bioassays with pesticides. In: Plants for toxicity assessment: 2nd volume. ASTM STP 1115, J.W. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, & M.A. Lewis, eds. American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana de Pruebas y Materiales). pp. 197 — 208.

▼**M6**

(7) Buhler, D.D. & Hoffman, M.L. 1999. Anderson's guide to practical methods of propagating weeds and other plants. Weed Science Society of America, Lawrence, K.

(8) Clapham, A.R., Tutin, T.G., & Warburg, E.F. 1981. Excursion flora of the British Isles, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

(9) Clay, P.A. & Griffin, J.L. 2000. Weed seed production and seedling emergence response to late-season glyphosate applications. Weed Science, 48:481-486.

(10) Cole, J.F.H. & Canning, L. 1993. Rationale for the choice of species in the regulatory testing of the effects of pesticides on terrestrial non-target plants. BCPC — Weeds. pp. 151 — 156.

(11) Fiely, M. (Ernst Conservation Seeds). 2004. Comunicación personal. (www.ernstseed.com)

(12) Fletcher, J.S., Johnson, F.L., & McFarlane, J.C. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environmental Toxicology & Chemistry, 9:769-776.

(13) Fletcher, J.S., Pfleeger, T.G., Ratsch, H.C., & Hayes, R. 1996. Potential impact of low levels of chlorsulfuron and other herbicides on growth and yield of nontarget plants. Environmental Toxicology & Chemistry, 15(7):1189-1196.

(14) Flynn, S., Turner, R.M., and Dickie, J.B. 2004. Seed Information Database (release 6.0, Oct 2004) Royal Botanic Gardens, Kew (www.rbgkew.org.uk/data/sid)

(15) Franzaring, J., Kempenaar, C., & Van der Eerden, L.J.M. 2001. Effects of vapours of chlorpropham and ethofumesate on wild plant species. Environmental Pollution, 114:21-28.

(16) Gleason, H.A. & Cronquist, A. 1991. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada, 2nd ed. New York Botanical Garden, Bronx, NY.

(17) Grime, J.P. 1981. The role of seed dormancy in vegetation dynamics. Annals of Applied Biology, 98:555-558.

(18) Grime, J.P., Mason, G., Curtis, A.V., Rodman, J., Band, S.R., Mowforth, M.A.G., Neal, A.M., & Shaw, S. 1981. A comparative study of germination characteristics in a local flora. Journal of Ecology, 69:1017-1059.

(19) Grime, J.P., Hodgson, J.G., & Hunt, R. 1988. Comparative plant ecology: a functional approach to common British species. Unwin Hyman Ltd., Londres.

(20) Kjaer, C. 1994. Sublethal effects of chlorsulfuron on black bindweed (*Polygonum convolvulus* L.). Weed Research, 34:453-459.

(21) Klingaman, T.E., King, C.A., & Oliver, L.R. 1992. Effect of application rate, weed species, and weed stage of growth on imazethapyr activity. Weed Science, 40:227-232.

(22) Marrs, R.H., Williams, C.T., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1989. Assessment of the effects of herbicide spray drift on a range of plant species of conservation interest. Environmental Pollution, 59:71-86.

(23) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of herbicide spray drift on selected species of nature conservation interest: the effects of plant age and surrounding vegetation structure. Environmental Pollution, 69:223-235.

(24) Marrs, R.H., Frost, A.J., & Plant, R.A. 1991. Effects of mecoprop drift on some plant species of conservation interest when grown in standardized mixtures in microcosms. Environmental Pollution, 73:25-42.

(25) Marrs, R.H., Frost, A.J., Plant, R.A., & Lunnis, P. 1993. Determination of buffer zones to protect seedlings of non-target plants from the effects of glyphosate spray drift. Agriculture, Ecosystems, & Environment, 45:283-293.

▼**M6**

(26) Marrs, R.H. & Frost, A.J. 1997. A microcosm approach to detection of the effects of herbicide spray drift in plant communities. Journal of Environmental Management, 50:369-388.

(27) Marshall, E.J.P. & Bernie, J.E. 1985. Herbicide effects on field margin flora. BCPC — Weeds. pp. 1021-1028.

(28) McKelvey, R.A., Wright, J.P., & Honegger, J.L. 2002. A comparison of crop and non-crop plants as sensitive species for regulatory testing. Pest Management Science 58, 1161-1174.

(29) Morton, S. (Herbiseed). 2004. Comunicación personal. (http://www.herbiseed.com)

(30) USDA, NRCS. 2004. The Plants Database, version 3.5. (http://plants.usda.gov). National Plant Data Centre, Baton Rouge, LA 70874-4490 Estados Unidos.

(31) US EPA. 1999. One-Liner Database. [U.S. E.P.A./Office of Pesticide Programs/Environmental Fate and Effects Division/Environmental Epidemiology Branch].

(32) Webster, R. H., 1979. Technical Report No. 56: Growing weeds from seeds and other propagules for experimental purposes. Agricultural Research Council Weed Research Organization, Oxford.

(33) White, A. L. & Boutin, C. (National Wildlife Research Centre, Environment Canada). 2004. Comunicación personal.

(34) Zwerger, P. & Pestemer, W. 2000. Testing the phytotoxic effects of herbicides on higher terrestrial non-target plants using a plant life-cycle test. Z. PflKrankh. PflSchutz, Sonderh., 17:711-718.

▼M6

*Apéndice 4*

**Ejemplos de condiciones adecuadas de cultivo para determinadas especies cultivadas**

Las siguientes condiciones se han considerado idóneas para diez especies cultivadas, y pueden utilizarse como orientación para los ensayos en cámaras de cultivo también con otras especies determinadas:

Concentración de dióxido de carbono: 350 ± 50 ppm;

Humedad relativa: 70 ± 5 % durante los períodos de luz y 90 ± 5 % durante los períodos de oscuridad;

Temperatura: 25 ± 3 °C por el día, 20 ± 3 °C por la noche;

Fotoperíodo: 16 horas de luz / 8 horas de oscuridad, partiendo de una media de longitud de onda de 400 a 700 nm;

Luz: luminancia de 350 ± 50 $\mu E/m^2/s$, medida en lo más alto del follaje.

Las especies cultivadas son las siguientes:

— tomate (*Solanum lycopersicum*);

— pepino (*Cucumis sativus*);

— lechuga (*Lactuca sativa*);

— soja (*Glycine max*);

— col (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

— zanahoria (*Daucus carota*);

— avena (*Avena sativa*);

— ballico (*Lolium perenne*);

— maíz (*Zea mays*);

— cebolla (*Allium cepa*).

▼M6

## C.32. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN DE ENQUITREIDOS

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 220 (2004). Está diseñado para utilizarse en la evaluación de los efectos de las sustancias sobre el resultado reproductor del gusano enquitreido, *Enchytraeus albidus*, Henle 1873, en el suelo. Se basa principalmente en un método desarrollado por el Umweltbundesamt de Alemania (1), que ha sido objeto de un ensayo interlaboratorios (2). También se han considerado otros métodos de ensayo de la toxicidad de las sustancias para los enquitreidos y las lombrices de tierra (3) (4) (5) (6) (7) (8).

### CONSIDERACIONES INICIALES

2. Los anélidos que viven en el suelo del género *Enchytraeus* son, desde el punto de vista ecológico, especies pertinentes para ensayos ecotoxicológicos. Si bien los enquitreidos se encuentran a menudo en los suelos que contienen lombrices de tierra, también es cierto que suelen abundar en muchos suelos de los que están ausentes las lombrices de tierra. Los enquitreidos puede utilizarse en pruebas de laboratorio, así como en estudios de semicampo y de campo. Desde un punto de vista práctico, muchas especies de *Enchytraeus* son fáciles de manejar y criar, y su tiempo de generación es considerablemente menor que el de las lombrices de tierra. La duración de un ensayo de reproducción con enquitreidos es, por tanto, de solo 4 - 6 semanas, mientras que con lombrices de tierra (*Eisenia fetida*) es de 8 semanas.

3. Puede encontrarse información básica sobre la ecología y la ecotoxicología de los enquitreidos en el medio ambiente terrestre en las referencias (9) (10) (11) (12).

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

4. Se exponen enquitreidos adultos a un intervalo de concentraciones de la sustancia problema mezclada con un suelo artificial. El ensayo puede dividirse en dos fases: a) un ensayo de determinación del intervalo, en caso de que no se disponga de suficiente información, en el que la mortalidad es el principal parámetro evaluado tras dos semanas de exposición, y b) un ensayo definitivo de reproducción, en el que se evalúan el número total de juveniles producidos por un animal padre y la supervivencia de los animales padres. La duración del ensayo definitivo es de seis semanas. Tras las tres primeras semanas se extraen las lombrices adultas y se registran los cambios morfológicos. Después de un período adicional de tres semanas, se cuenta el número de descendientes, nacidos de los capullos producidos por los adultos. El resultado reproductor de los animales expuestos a la sustancia problema se compara con el del control o controles a fin de determinar i) la concentración sin efecto observado (NOEC) y/o ii) una $EC_x$ (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{50}$) aplicando un modelo de regresión para estimar la concentración que causaría una reducción del x % del resultado reproductor. Las concentraciones de ensayo deben englobar la $EC_x$ (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{50}$) de forma que el valor de $EC_x$ se obtenga por interpolación y no por extrapolación.

### INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

5. Es preferible conocer la hidrosolubilidad, el log $K_{ow}$, el coeficiente de reparto agua/suelo (véase, por ejemplo, el capítulo C.18 o C.19 del presente anexo) y la presión de vapor de la sustancia problema. Es conveniente disponer de información adicional sobre el destino de la sustancia problema en el suelo, tal como las velocidades de hidrólisis y de fotólisis.

6. Este método de ensayo puede utilizarse para sustancias tanto solubles como insolubles en agua. Sin embargo, el modo de aplicación de la sustancia problema variará en consecuencia. El método de ensayo no es aplicable a las sustancias volátiles, es decir, sustancias cuya constante de Henry o cuyo coeficiente de reparto aire/agua sea superior a uno, o sustancias cuya presión de vapor a 25 °C supere los 0,0133 Pa.

▼M6

VALIDEZ DEL ENSAYO

7. Para que el ensayo sea válido, los controles deben cumplir los criterios de comportamiento siguientes:

— la mortalidad de adultos no debe ser superior al 20 % al final del ensayo de determinación del intervalo y después de las tres primeras semanas del ensayo de reproducción;

— en el supuesto de que se utilicen diez adultos por recipiente en el diseño del ensayo, debe haberse producido al final del ensayo una media de al menos veinticinco juveniles por recipiente;

— el coeficiente de variación alrededor del número medio de juveniles no debe ser superior al 50 % al final del ensayo de reproducción.

Cuando un ensayo no cumpla los criterios de validez arriba indicados, el ensayo debe interrumpirse, salvo que pueda aportarse una justificación para continuar con él. La justificación deberá incluirse en el informe.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

8. Es necesario someter a ensayo una sustancia de referencia a intervalos regulares, o bien incluirla en cada ensayo, para verificar que la respuesta de los organismos de ensayo no ha cambiado de forma significativa a lo largo del tiempo. La carbendazima es una sustancia de referencia adecuada de la que se ha visto que afecta a la supervivencia y reproducción de los enquitreidos (13) (14), pero pueden utilizarse otras sustancias cuyos datos de toxicidad sean bien conocidos. En un ensayo interlaboratorios se utilizó una formulación de carbendazima conocida por el nombre comercial de Derosal™, suministrada por AgrEvo Company (Francfort, Alemania) y que contiene 360 g/l de principio activo (32,18 %) (2). La $EC_{50}$ para la reproducción determinada en la prueba interlaboratorios era del orden de 1,2 ± 0,8 mg de principio activo (p. a.) por kg de masa seca (2). Si se incluye un patrón tóxico positivo en la serie de ensayo, se utiliza una sola concentración y el número de réplicas debe ser el mismo que el de los controles. Por lo que respecta a la carbendazima, se recomienda el ensayo de 1,2 mg p. a./kg de peso seco (ensayo con la formulación líquida).

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

**Equipo**

9. Los recipientes de ensayo serán de vidrio o de otro material químicamente inerte. Son adecuados los frascos de vidrio (por ejemplo, volumen: 0,20 - 0,25 litros; diámetro: ≈ 6 cm). Deben disponer de tapas transparentes (por ejemplo, de vidrio o de polietileno) diseñadas de forma que se reduzca la evaporación, pero permitiendo al mismo tiempo el intercambio de gases entre el suelo y la atmósfera. Las tapas deben ser transparentes para permitir la transmisión de la luz.

10. Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

— estufa secadora;

— microscopio estereoscópico;

— pH-metro y fotómetro;

— balanzas exactas adecuadas;

— equipo adecuado para el control de la temperatura;

— equipo adecuado para el control de la humedad (no esencial si los recipientes de exposición tienen tapa);

— incubadora o pequeña sala con aire acondicionado;

— pinzas, ganchos o asas;

— cubeta de revelado fotográfico.

**Preparación del suelo artificial**

11. En este ensayo se utiliza un suelo artificial (5) (7) con la siguiente composición (en peso seco, secado hasta peso constante a 105 °C):

▼**M6**

— 10 % de turba esfágnea, secada al aire y finamente molida (es aceptable un tamaño de partícula de 2 ± 1 mm); antes de su utilización en un ensayo, es recomendable comprobar que un suelo elaborado con un nuevo lote de turba es adecuado para el cultivo de lombrices;

— 20 % de caolín, con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

— aproximadamente entre 0,3 y 1,0 % de carbonato de calcio ($CaCO_3$, pulverizado, de pureza analítica) para obtener un pH de 6,0 ± 0,5; la cantidad de carbonato de calcio añadido puede depender principalmente de la calidad o naturaleza de la turba;

— alrededor del 70 % de arena de cuarzo secada al aire (dependiendo de la cantidad necesaria de $CaCO_3$), en su mayor parte en forma de arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm.

Es aconsejable demostrar la aptitud de un suelo artificial para el cultivo de los gusanos y el cumplimiento de los criterios de validez del ensayo antes de utilizar el suelo en un ensayo definitivo. En particular, se recomienda hacer un control de ese tipo para garantizar que los resultados del ensayo no se vean comprometidos si el contenido de carbono orgánico del suelo artificial se reduce, por ejemplo rebajando el contenido de turba al 4-5 % y aumentando análogamente el contenido de arena. Con esta reducción del contenido de carbono orgánico, es posible que disminuyan las posibilidades de adsorción de la sustancia problema al suelo (carbono orgánico) y que aumente la disponibilidad de la sustancia problema para los gusanos. Se ha demostrado que *Enchytraeus albidus* puede ajustarse a los criterios de validez sobre la reproducción cuando se somete a ensayo en suelos de campo con un contenido de carbono orgánico menor que el mencionado más arriba (p. ej., del 2,7 %) (15), y la experiencia (si bien es limitada) demuestra que esto también puede conseguirse en suelo artificial con un 5 % de turba.

*Nota:* Cuando se utiliza suelo natural en ensayos adicionales (por ejemplo, de nivel superior), deben demostrarse también la idoneidad del suelo y el respeto de los criterios de validez del ensayo.

12. Los componentes secos del suelo se mezclan a fondo (por ejemplo, en un mezclador de laboratorio de gran escala). Esta operación debe efectuarse al menos una semana antes de que se inicie el ensayo. El suelo mezclado debe mantenerse durante dos días con el fin de equilibrar o estabilizar la acidez. Para la determinación del pH se utiliza una mezcla de suelo y solución de cloruro de potasio 1 M (KCl) o de cloruro de calcio 0,01 M ($CaCl_2$) en una proporción de 1:5 (véase la referencia (16) y el apéndice 3). Si el suelo es más ácido que la banda exigida (véase el punto 11), puede ajustarse añadiendo una cantidad adecuada de $CaCO_3$. Si el suelo es demasiado alcalino, puede ajustarse mediante la adición de más cantidad de la mezcla, mencionada en el punto 11, pero excluyendo el $CaCO_3$.

13. La capacidad máxima de retención de agua del suelo artificial se determina de acuerdo con los procedimientos descritos en el apéndice 2. Uno o dos días antes del inicio del ensayo, el suelo artificial seco se prehumedece, añadiéndole una cantidad suficiente de agua desionizada para obtener aproximadamente la mitad del contenido final de agua, que supone de un 40 a un 60 % de la capacidad máxima de retención de agua. Al inicio del ensayo, el suelo prehumedecido se divide en las partes correspondientes al número de concentraciones de ensayo (y de sustancias de referencia en su caso) y de controles utilizados en el ensayo. El contenido de humedad se ajusta al 40 - 60 % de la capacidad máxima de retención de agua mediante la adición de

▼M6

la solución de la sustancia problema y/o añadiendo agua desionizada o destilada (véanse los puntos 19 a 21). Se determina el contenido de humedad al inicio y al final del ensayo (por secado hasta la obtención de un peso constante a 105 °C); dicho contenido debe estar en la banda óptima para la supervivencia de las lombrices. Una estimación general del contenido de humedad del suelo puede obtenerse apretando el suelo suavemente con la mano; si el contenido de humedad es correcto, deben aparecer gotitas de agua entre los dedos.

**Selección y preparación de los animales de ensayo**

14. La especie recomendada es *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (gusano blanco), miembro de la familia *Enchytraeidae* (orden *Oligochaeta*, filum *Annelida*). *E. albidus* es una de las mayores especies de enquitreidos, y se han observado especímenes de hasta 35 mm de longitud (17) (18). *E. albidus* tiene distribución mundial y se encuentra en hábitats marinos, de agua dulce y terrestres, sobre todo en materia orgánica en descomposición (algas, compost) y raramente en praderas (9). Su amplia tolerancia ecológica y algunas variaciones morfológicas podrían indicar que existen diferentes razas.

15. *E. albidus* se encuentra en el comercio, como alimento para peces. Ha de comprobarse si el cultivo está contaminado con otras especies, generalmente más pequeñas (1) (19). Si hay contaminación, se deben lavar todos los gusanos con agua en una placa Petri. Se seleccionan a continuación los ejemplares adultos grandes de *E. albidus* (empleando un microscopio estereoscópico) para iniciar un nuevo cultivo y se desechan todos los demás gusanos. *E. albidus* pueden criarse en una amplia gama de materiales orgánicos (véase el apéndice 4). El ciclo de vida de *E. albidus* es corto, ya que se alcanza la madurez entre los 33 días (a 18 °C) y los 74 días (a 12 °C) (1). Se utilizarán para el ensayo solo los cultivos que hayan permanecido sin problemas en el laboratorio al menos cinco semanas (una generación).

16. Son también adecuadas otras especies del género *Enchytraeus*, por ejemplo *E. buchholzi* Vejdovsky 1879 o *E. crypticus* Westheide & Graefe 1992 (véase el apéndice 5). Si se utilizan otras especies de *Enchytraeus*, deben identificarse claramente y hay que indicar los motivos por los que se han seleccionado.

17. Los animales utilizados en los ensayos son gusanos adultos. Deben tener huevos (puntos blancos) en la región del clitelo, y ser aproximadamente del mismo tamaño (de aproximadamente 1 cm de longitud). No es necesario sincronizar el cultivo de cría.

18. Si los enquitreidos no se crían en el mismo tipo de suelo y en las mismas condiciones (incluida la alimentación) que se utilizan para el ensayo final, deben aclimatarse durante al menos 24 horas y hasta tres días. Conviene, en un primer momento, aclimatar un número de adultos mayor que el necesario para realizar el ensayo, a fin de dejar margen suficiente para el rechazo de especímenes dañados o inadecuados por cualquier otro concepto. Al final de la fase de aclimatación, se seleccionan para el ensayo solo los gusanos que contengan huevos y no presenten anomalías de comportamiento (por ejemplo, que traten de escapar del suelo). Los gusanos se retiran cuidadosamente utilizando pinzas de joyero, ganchos o asas y se colocan en una placa Petri que contenga una pequeña cantidad de agua dulce. Con este objeto es preferible utilizar agua dulce reconstituida según lo propuesto en el capítulo C.20 del presente anexo (ensayo de reproducción en *Daphnia magna*), ya que el agua desionizada, desmineralizada o del grifo puede ser nociva para los gusanos. Los gusanos se inspeccionan con un microscopio estereoscópico y se eliminan los que no contengan huevos. Se ha de tener cuidado para retirar y desechar los ácaros o colémbolos que puedan haber infectado los cultivos. Los gusanos sanos no utilizados para el ensayo se devuelven al cultivo madre.

▼M6

**Preparación de las concentraciones de ensayo**

*Sustancia problema hidrosoluble*

19. Se prepara una solución de la sustancia problema en agua desionizada en una cantidad suficiente para todas las réplicas de una sola concentración de ensayo. Se recomienda utilizar una cantidad apropiada de agua para conseguir el contenido necesario de humedad, es decir, entre el 40 y el 60 % de la capacidad máxima de retención de agua (véase el punto 13). Cada una de las soluciones de la sustancia problema se mezcla a fondo con un lote de suelo prehumedecido antes de introducirla en el recipiente de ensayo.

*Sustancia problema no hidrosoluble*

20. En el caso de las sustancias no solubles en el agua, pero solubles en disolventes orgánicos, la sustancia problema puede disolverse en el volumen mínimo posible de un vehículo adecuado (por ejemplo, acetona). Solo deben utilizarse disolventes volátiles. El vehículo se rocía sobre una pequeña cantidad, como, por ejemplo, 2,5 g de arena de cuarzo fina, o se mezcla con ella. El vehículo se elimina por evaporación bajo una campana extractora durante al menos una hora. Esta mezcla de arena de cuarzo y sustancia problema se añade al suelo prehumedecido y se mezcla completamente después de añadir la cantidad adecuada de agua desionizada para obtener la humedad necesaria. La mezcla final se introduce en los recipientes de ensayo.

21. En el caso de sustancias poco solubles en agua y en disolventes orgánicos, se mezcla el equivalente de 2,5 g de arena de cuarzo finamente molida por recipiente de ensayo con la cantidad de sustancia problema necesaria para obtener la concentración de ensayo deseada. Esta mezcla de arena de cuarzo y sustancia problema se añade al suelo prehumedecido y se mezcla completamente después de añadir la cantidad adecuada de agua desionizada para obtener el contenido necesario de humedad. La mezcla final se divide entre los recipientes de ensayo. Se repite el procedimiento para cada concentración de ensayo, y se prepara asimismo un control adecuado.

22. Normalmente, las sustancias no deben someterse a ensayo a concentraciones superiores a 1 000 mg/kg de masa seca de suelo. Sin embargo, puede ser necesario efectuar ensayos a concentraciones más elevadas, de conformidad con los objetivos de un ensayo específico.

REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS

**Grupos de ensayo y controles**

23. Respecto a cada concentración de ensayo, se coloca en el recipiente de ensayo una cantidad de suelo de ensayo correspondiente a 20 g de peso seco, (véanse los puntos 19 - 21). Se preparan también controles, sin la sustancia problema. A cada recipiente se añaden alimentos con arreglo a los procedimientos descritos en el punto 29. Se asignan aleatoriamente diez gusanos a cada recipiente de ensayo. Los gusanos se transfieren con cuidado a cada recipiente de ensayo y se colocan en la superficie del suelo, por ejemplo utilizando pinzas de joyero, ganchos o asas. El número de réplicas para las concentraciones de ensayo y para los controles dependerá del diseño del ensayo (véase el punto 34). Los recipientes de ensayo se colocan en la incubadora de ensayo de forma aleatoria, y estas posiciones se vuelven a aleatorizar cada semana.

24. Si se utiliza un vehículo para la aplicación de la sustancia problema, debe someterse a ensayo, además de la serie con la sustancia problema, una serie de control con arena de cuarzo rociada o mezclada con el disolvente. La concentración de disolvente o dispersante ha de ser igual a la usada en los recipientes de ensayo que contienen la sustancia problema. Debe realizarse el ensayo de una serie de control con arena de cuarzo adicional (2,5 g por recipiente) en caso de sustancias que requieran añadirse de conformidad con los procedimientos descritos en el punto 21.

▼M6

**Condiciones del ensayo**

25. La temperatura de ensayo es de 20 ± 2 °C. Para disuadir a los gusanos de escaparse del suelo, se efectúa el ensayo en ciclos controlados de luz y oscuridad (preferentemente de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con una iluminación de 400 a 800 lux en la zona de los recipientes de ensayo.

26. Con el fin de controlar la humedad del suelo, los recipientes se pesan al principio del ensayo y, posteriormente, una vez por semana. La pérdida de peso se compensa con la adición de una cantidad adecuada de agua desionizada. Cabe señalar que la pérdida de agua puede reducirse mediante el mantenimiento de una alta humedad ambiental (> 80 %) en la incubadora de ensayo.

27. El contenido de humedad y el pH han de medirse al principio y al final tanto de la prueba de determinación del intervalo como del ensayo definitivo. Deben efectuarse mediciones en muestras del suelo control y tratado (todas las concentraciones) que se habrán preparado y mantenido en las mismas condiciones que los cultivos de ensayo, pero sin adición de gusanos. Solo deben añadirse alimentos a estas muestras de suelo al comienzo del ensayo para facilitar la actividad microbiana. La cantidad de alimentos que se añade debe ser la misma que se añade a los cultivos de ensayo. No es necesario añadir más alimentos a estos recipientes durante el ensayo.

**Alimentación**

28. Pueden utilizarse alimentos capaces de mantener la población de enquitreidos. Se ha visto que los copos de avena, preferiblemente tratados en el autoclave antes de su utilización para evitar la contaminación microbiana (el calentamiento también es adecuado), constituyen un alimento adecuado.

29. Los alimentos se añaden, al inicio, mezclando 50 mg de copos de avena molidos con el suelo de cada recipiente antes de introducir los gusanos. Después, los alimentos se suministran una vez por semana hasta el día 21. No se añaden alimentos el día 28, puesto que los adultos se han retirado en esta fase y los gusanos juveniles necesitan relativamente poca comida adicional más allá de este punto. Durante el ensayo, la alimentación se compone de 25 mg de copos de avena molidos por recipiente colocados cuidadosamente en la superficie del suelo para evitar dañar a los gusanos. Con el fin de reducir el crecimiento de hongos, los copos de avena deben enterrarse en el suelo cubriéndolos con pequeñas cantidades de este. Si queda comida sin consumir, la ración alimentaria debe reducirse.

**Diseño para el ensayo de determinación del intervalo**

30. Cuando sea necesario, se llevará a cabo un ensayo de determinación del intervalo con, por ejemplo, cinco concentraciones de la sustancia problema, de 0,1, 1,0, 10, 100 y 1 000 mg/kg (peso seco de suelo). Es suficiente con una sola réplica para cada tratamiento y control.

31. La duración del ensayo de determinación del intervalo es de seis semanas. Al final del ensayo se determina la mortalidad de los gusanos. Se considera que un gusano está muerto si no reacciona ante un estímulo mecánico en el extremo anterior. Puede ser útil disponer de otros datos además de la mortalidad a la hora de decidir sobre el intervalo de concentraciones que debe usarse en el ensayo definitivo. Por tanto, también deben registrarse los cambios en el comportamiento de los adultos (por ejemplo, si se vuelven incapaces de excavar en el suelo o si se quedan inmóviles junto a la pared de vidrio del recipiente de ensayo) y en su morfología (p. ej., si tienen heridas abiertas), además de la eventual presencia de juveniles. Esta última puede determinarse con el método de tinción descrito en el apéndice 6.

32. La $LC_{50}$ puede determinarse aproximadamente calculando la media geométrica de los datos de mortalidad. Al determinar el intervalo de concentraciones para el ensayo definitivo, se supone que la concentración con efecto sobre la reproducción es hasta diez veces inferior a la $LC_{50}$. No obstante, se

▼M6

trata de una relación empírica y en algún caso específico podría ser diferente. Las observaciones adicionales realizadas en el ensayo de determinación del intervalo de concentraciones, tales como la presencia de juveniles, pueden contribuir a afinar el intervalo de concentraciones de la sustancia problema que debe utilizarse en el ensayo definitivo.

33. Con el fin de determinar de forma exacta la $LC_{50}$, se recomienda realizar el ensayo utilizando un mínimo de cuatro réplicas de cada concentración de la sustancia problema y un número adecuado de concentraciones que causen al menos cuatro respuestas medias con diferencias estadísticamente significativas a estas concentraciones. Para los controles se utiliza un número similar de concentraciones y de réplicas, en su caso.

**Diseño para el ensayo definitivo de reproducción**

34. Se proponen tres diseños sobre la base de las recomendaciones derivadas de una prueba interlaboratorios (2).

— Para la determinación de la NOEC deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones en serie geométrica. Se recomienda utilizar cuatro réplicas de cada concentración de ensayo más ocho controles. Las concentraciones deben estar separadas por un factor que no exceda de 1,8.

— Para la determinación de una $EC_x$ (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{50}$), deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones, entre las que debe quedar englobada la $EC_x$ a fin de obtenerla mediante interpolación y no extrapolación. Se recomienda utilizar al menos cuatro réplicas de cada concentración de ensayo y cuatro réplicas de control. El factor de espaciado puede variar, es decir, ser igual o inferior a 1,8 en el intervalo de efecto previsto y superior a 1,8 a concentraciones superiores e inferiores.

— Un enfoque combinado permite la determinación tanto de la NOEC como de la $EC_x$. Deben utilizarse ocho concentraciones de tratamiento en progresión geométrica. Se recomienda utilizar cuatro réplicas de cada tratamiento más ocho controles. Las concentraciones deben estar separadas por un factor que no exceda de 1,8.

35. Se deben utilizar diez gusanos adultos por recipiente de ensayo (véase el punto 23). Se añaden alimentos a los recipientes de ensayo al inicio del ensayo y, a continuación, una vez por semana (véase el punto 29) hasta el día 21, incluido. El día 21 se toman a mano muestras de suelo y se observan y recuentan los gusanos adultos vivos, y se registran los cambios en el comportamiento (por ejemplo, si se vuelven incapaces de excavar en el suelo o si se quedan inmóviles junto a la pared de vidrio del recipiente de ensayo) y en la morfología (p. ej., si tienen heridas abiertas). A continuación, se retiran todos los gusanos adultos de los recipientes de ensayo y del suelo de ensayo. El suelo de ensayo que contiene los capullos que se hayan producido se incuba durante tres semanas adicionales en las mismas condiciones de ensayo, salvo que solo se añaden alimentos el día 35 (es decir, 25 mg de copos de avena molidos por recipiente).

36. Después de seis semanas, se efectúa el recuento de los gusanos recién nacidos. Se recomienda el método basado en la tinción con rojo de Bengala (véase el apéndice 6), aunque también se ha comprobado que son adecuadas otras técnicas de extracción y flotación por vía húmeda (pero sin calentamiento) (véase el apéndice 6) (4) (10) (11) (20). Se recomienda la tinción con rojo de Bengala porque la extracción por vía húmeda a partir de un sustrato de suelo puede verse obstaculizada por la turbidez causada por partículas de arcilla en suspensión.

**Ensayo límite**

37. Si no se observan efectos a la concentración máxima en el ensayo de determinación del intervalo (es decir, 1 000 mg/kg), el ensayo de reproducción puede realizarse como un ensayo límite con 1 000 mg/kg, con el fin de demostrar que la NOEC para la reproducción es superior a ese valor.

▼M6

**Resumen y calendario del ensayo**

38. Las etapas del ensayo pueden resumirse como sigue:

| Día | Ensayo de determinación del intervalo | Ensayo definitivo |
|---|---|---|
| Día –7 o antes | — Preparación del suelo artificial (mezcla de los componentes secos) | — Preparación del suelo artificial (mezcla de los componentes secos) |
| Día –5 | — Verificación del pH del suelo artificial<br>— Medición de la capacidad máxima de retención de agua del suelo | — Verificación del pH del suelo artificial<br>— Medición de la capacidad máxima de retención de agua del suelo |
| Días –5 a –3 | — Clasificación de las lombrices para su aclimatación | — Clasificación de las lombrices para su aclimatación |
| Días –3 a 0 | — Aclimatación de las lombrices durante al menos 24 horas | — Aclimatación de las lombrices durante al menos 24 horas |
| Día –1 | — Prehumidificación del suelo artificial y distribución en lotes | — Prehumidificación del suelo artificial y distribución en lotes |
| Día 0 | — Preparación de las soluciones madre<br>— Aplicación de la sustancia problema<br>— Pesada del sustrato problema en los recipientes de ensayo<br>— Adición de los alimentos<br>— Introducción de las lombrices<br>— Medición del pH y del contenido de humedad del suelo | — Preparación de las soluciones madre<br>— Aplicación de la sustancia problema<br>— Pesada del sustrato problema en los recipientes de ensayo<br>— Adición de los alimentos<br>— Introducción de las lombrices<br>— Medición del pH y del contenido de humedad del suelo |
| Día 7 | — Comprobación del contenido de humedad del suelo | — Comprobación del contenido de humedad del suelo<br>— Adición de alimentos |
| Día 14 | — Determinación de la mortalidad de los adultos<br>— Estimación del número de juveniles<br>— Medición del pH y del contenido de humedad del suelo | — Comprobación del contenido de humedad del suelo<br>— Adición de alimentos |
| Día 21 | | — Observación del comportamiento de los adultos<br>— Retirada de los adultos<br>— Determinación de la mortalidad de los adultos<br>— Comprobación del contenido de humedad del suelo<br>— Adición de alimentos |
| Día 28 | | — Comprobación del contenido de humedad del suelo<br>— Sin adición de alimentos |
| Día 35 | | — Comprobación del contenido de humedad del suelo<br>— Adición de alimentos |
| Día 42 | | — Recuento de los gusanos juveniles<br>— Medición del pH y del contenido de humedad del suelo |

▼M6

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

39. A pesar de que se da una visión de conjunto en el apéndice 7, en este método de ensayo no se incluye ninguna orientación estadística definitiva para el análisis de los resultados del ensayo.

40. En la prueba de determinación del intervalo, el parámetro principal es la mortalidad. Sin embargo, también deben registrarse los cambios en el comportamiento (por ejemplo, si se vuelven incapaces de excavar en el suelo o si se quedan inmóviles junto a la pared de vidrio del recipiente de ensayo) y en la morfología (p. ej., si tienen heridas abiertas) de los gusanos adultos, además de la eventual presencia de juveniles. Para determinar la $LC_{50}$ debe aplicarse en principio el análisis de probit (21) o la regresión logística. No obstante, en aquellos casos en que este método de análisis no sea adecuado (por ejemplo, si se dispone de menos de tres concentraciones con mortalidades parciales) pueden utilizarse métodos alternativos. Entre estos métodos pueden figurar el de medias móviles (22), el método de Spearman-Karber recortado (23) o una interpolación simple (p. ej., media geométrica de $LC_0$ y $LC_{100}$, calculada multiplicando la raíz cuadrada de $LC_0$ por $LC_{100}$).

41. En el ensayo definitivo, el parámetro del ensayo es la fecundidad (es decir, el número de juveniles producidos). Sin embargo, como en el ensayo de determinación del intervalo, deben registrarse en el informe final todos los demás signos de naturaleza nociva. El análisis estadístico requiere que se calculen la media aritmética y la desviación típica por grupo de tratamiento y por grupo de control en cuanto a la reproducción.

42. Si se ha realizado el análisis de la varianza, la desviación típica, s, y los grados de libertad, df, pueden sustituirse respectivamente por la estimación de la varianza «agrupada» obtenida del ANOVA y por sus grados de libertad, siempre que la varianza no dependa de la concentración. En este caso, se utilizarán las distintas varianzas de los controles y de los grupos tratados. Estos valores son calculados en general por programas estadísticos comerciales utilizando los resultados de cada recipiente como réplicas. Si la «agrupación» de datos de los controles negativo y de disolvente parece más razonable que hacer las pruebas respecto a uno solo de estos conjuntos, debe comprobarse que no son significativamente diferentes (sobre pruebas apropiadas, véanse el punto 45 y el apéndice 7).

43. La realización de más pruebas estadísticas y de deducciones depende de si los valores de las réplicas se distribuyen normalmente y son homogéneas en lo que respecta a su varianza.

**Estimación de la NOEC**

44. Es preferible la aplicación de ensayos potentes. Se debería utilizar la información previa obtenida, por ejemplo a partir de la experiencia con ensayos interlaboratorios u otros datos históricos, sobre si los datos presentan una distribución aproximadamente normal. Es más crítica la homogeneidad de la varianza (homoscedasticidad). La experiencia indica que la varianza suele aumentar cuando sube la media. En estos supuestos, una transformación de los datos podría llevar a la homoscedasticidad. Sin embargo, esta transformación debe basarse en la experiencia con datos históricos, más que en los datos objeto de la investigación. Con datos homogéneos, deben llevarse a cabo pruebas t de comparación múltiple, como la prueba de Williams ($\alpha$ = 0,05, unilateral) (24) (25) o, en algunos casos, la prueba de Dunnett (26) (27). Cabe señalar que, en caso de replicación desigual, los valores t del cuadro deberán corregirse según lo sugerido por Dunnett y Williams. En ocasiones, debido a una gran variación, las respuestas no aumentan o disminuyen regularmente. En este caso de fuerte desviación respecto a la monotonicidad, es más conveniente la prueba de Dunnett. En caso de que haya desviaciones con respecto a la homoscedasticidad, puede resultar razonable analizar más estrechamente los posibles efectos sobre las varianzas,

▼M6

a fin de decidir si las pruebas t pueden aplicarse sin perder mucha potencia (28). De forma alternativa, puede aplicarse una prueba U de comparación múltiple, por ejemplo la prueba U de Bonferroni según Holm (29), o, cuando estos datos presenten heteroscedasticidad pero por lo demás sean coherentes con una relación dosis-respuesta monótona subyacente, otra prueba no paramétrica [por ejemplo, una prueba de Jonckheere-Terpstra (30) (31) o Shirley (32) (33)] y, en general, se dará preferencia a estas pruebas frente a las pruebas t de varianza desigual (véase también el esquema del apéndice 7).

45. En caso de que se haya realizado un ensayo límite y se cumplan los requisitos previos de procedimientos de ensayos paramétricos (normalidad, homogeneidad), puede utilizarse la prueba t de Student pareada o, si no, el procedimiento de la prueba U de Mann-Whitney (29).

**Estimación de $EC_x$**

46. Para calcular cualquier valor de $EC_x$ se utilizan las medias por tratamiento para el análisis de regresión (lineal o no lineal), tras haber obtenido una función dosis-respuesta adecuada. En relación con el crecimiento de los gusanos como respuesta continua, pueden calcularse los valores de $EC_x$ utilizando el análisis de regresión adecuado (35). Entre las funciones adecuadas para los datos cuánticos (mortalidad/supervivencia y número de descendientes producidos) están las funciones sigmoideas normales, logísticas o de Weibull, con entre dos y cuatro parámetros, algunas de las cuales pueden modelizar también respuestas horméticas. Si la función dosis-respuesta se ha ajustado mediante análisis de regresión lineal, debe determinarse con el análisis de regresión un $r^2$ (coeficiente de determinación) y/o una pendiente significativos antes de estimar la $EC_x$ mediante la inserción de un valor correspondiente a x % de la media del control en la ecuación encontrada con el análisis de regresión. Se calculan límites de confianza del 95 % con arreglo al método de Fieller [citado en Finney (21)] u otros métodos adecuados modernos.

47. Otra posibilidad consiste en modelizar la respuesta como porcentaje o proporción del parámetro del modelo que se interpreta como la respuesta media del control. En estos casos, la curva sigmoidea normal (logística, Weibull) puede ajustarse a menudo fácilmente a los resultados utilizando el método de regresión de probit (21). En estos casos, la función de ponderación ha de ajustarse para respuestas métricas según indica Christensen (36). No obstante, si se ha observado hormesis, el análisis de probit debe ser sustituido por una función logística o de Weibull de cuatro parámetros, ajustada por un método de regresión no lineal (36). Si no puede ajustarse a los datos una función dosis-respuesta adecuada, podrán utilizarse métodos alternativos para calcular el valor de $EC_x$ y sus límites de confianza, tales como el método de medias móviles de Thompson (22) y el de Spearman-Karber recortado (23).

INFORME DEL ENSAYO

48. El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes (p, ej., hidrosolubilidad, presión de vapor, etc.),

— identificación química de la sustancia problema según la nomenclatura de la IUPAC, número CAS, lote de fabricación, lote de acondicionamiento, fórmula estructural y pureza,

— fecha de expiración de la muestra.

*Especies de ensayo:*

— animales utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría.

*Condiciones de ensayo:*

— ingredientes y preparación del suelo artificial,

▼M6

— método de aplicación de la sustancia problema,

— descripción de las condiciones de ensayo, como la temperatura, la humedad, el pH, etc.,

— descripción completa del diseño experimental y procedimientos.

*Resultados del ensayo:*

— mortalidad de los gusanos adultos tras dos semanas y número de juveniles al final del ensayo de determinación del intervalo,

— mortalidad de los gusanos adultos tras una exposición de tres semanas y registro completo de los juveniles al final del ensayo de determinación del intervalo,

— cualquier síntoma físico o patológico y cambio en el comportamiento de los organismos de ensayo que se haya observado,

— la $LC_{50}$, la NOEC y/o $EC_x$ (p. ej., $EC_{50}$, $EC_{10}$) para la reproducción si algunas de ellas son aplicables con intervalos de confianza, y un gráfico del modelo ajustado utilizado para su cálculo, todas las informaciones y observaciones útiles para la interpretación de los resultados.

Las eventuales desviaciones respecto a los procedimientos descritos en el presente método de ensayo y cualquier acontecimiento inusual ocurrido en el ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Römbke, J. (1989). Entwicklung eines Reproduktionstests an Bodenorganismen — Enchytraeen. Abschlußbericht des Battelle-Instituts e.V. Frankfurt für das Umweltbundesamt Berlin, FE-Vorhaben 106 03 051/01.

(2) Römbke, J. and Moser, T. (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the Validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150 + 223 pp.

(3) Westheide, W. and Bethge-Beilfuss, D. (1991). The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results, In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Ed. by Esser, G. and Overdieck, D. pp 497-508. Elsevier, Amsterdam,

(4) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

(5) Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

(6) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1993). Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes sobre las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*). Parte 1: Determinación de la toxicidad aguda utilizando un sustrato de suelo artificial, nº 11268-1. ISO, Ginebra.

(7) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1996). Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes en lombrices (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción, nº 11268-2. ISO, Ginebra.

(8) Rundgren, S. and A.K. Augustsson (1998). Test on the enchytraeid *Cognettia sphagnetorum* (Vejdovsky 1877). En: Løkke, H. and C.A.M. Van Gestel, Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley and Sons, Chichester, 73-94.

(9) Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23, 217-232.

(10) Römbke, J. (1995). Enchytraeen (Oligochaeta) als Bioindikator, UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 7, 246-249.

(11) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Nueva York.

▼M6

(12) Didden, W.A.M. (1993). Ecology of terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37, 2-29.

(13) Becker, H. (1991). Bodenorganismen — Prüfungskategorien der Forschung. UWSF — Z. Umweltchem. Ökotox. 3, 19-24.

(14) Römbke, J. and Federschmidt, A. (1995). Effects of the fungicide Carbendazim on Enchytraeidae in laboratory and field tests, Newsletter on Enchytraeidae 4, 79-96.

(15) Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Enchytraeen als Testorganismen. En: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(16) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1994). Calidad del suelo, Determinación del pH, nº 10390. ISO, Ginebra.

(17) Bell, A.W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902, 1-13.

(18) Nielsen, C.O. and Christensen, B. (1959). The Enchytraeidae, critical revision and taxonomy of European species. Natura Jutlandica 8-9, 1-160.

(19) Bouguenec, V. y Giani, N. (1987). Deux nouvelles espèces d'*Enchytraeus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) et redescription d'*E. bigeminus*. Remarques sur le genre *Enchytraeus*. Ann. Limnol. 23, 9-22.

(20) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

(21) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(22) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, Londres.

(23) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(24) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(25) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(26) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(27) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(28) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361.

(29) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(30) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(31) Terpstra, T.J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(32) Shirley, E.A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

▼**M6**

(33) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(34) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. Nueva York.

(35) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(36) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

*Apéndice 1*

**Definiciones**

A efectos del presente método de ensayo, se aplicarán las siguientes definiciones:

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**$EC_x$** (concentración con efecto al x %): concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado período de exposición cuando se compara con un control. En este ensayo las concentraciones con efecto se expresan en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo.

**$LC_0$** (concentración no letal): concentración de una sustancia problema que no mata a ninguno de los organismos de ensayo expuestos dentro de un determinado período de tiempo. En este ensayo la $LC_0$ se expresa en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo.

**$LC_{50}$** (concentración letal mediana): concentración de una sustancia problema que mata al 50 % de los organismos de ensayo expuestos dentro de un determinado período de tiempo. En este ensayo la $LC_{50}$ se expresa en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo.

**$LC_{100}$** (concentración totalmente letal): concentración de una sustancia problema que mata al 100 % de los organismos de ensayo expuestos dentro de un determinado período de tiempo. En este ensayo la $LC_{100}$ se expresa en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo.

**LOEC** (concentración mínima con efecto observado): concentración mínima de la sustancia problema que tiene un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$). En este ensayo la LOEC se expresa en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo. Todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben presentar normalmente un efecto que es estadísticamente diferente del del control. Cualquier desviación respecto de lo anterior en la determinación de la LOEC debe justificarse en el informe de ensayo.

**NOEC** (concentración sin efecto observado): concentración más elevada de la sustancia problema inmediatamente por debajo de la LOEC a la que no se observa ningún efecto. En este ensayo, la concentración correspondiente a la NOEC no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro de un determinado período de exposición en comparación con el control.

**Tasa de reproducción**: número medio de gusanos juveniles producidos por un número de gusanos adultos durante el período de ensayo.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼**M6**

*Apéndice 2*

**Determinación de la capacidad máxima de retención de agua**

**Determinación de la capacidad de retención de agua del suelo artificial**

El siguiente método se ha considerado apropiado. Se describe en el anexo C de la norma ISO DIS 11268-2.

Se recoge una determinada cantidad (p. ej., 5 g) del sustrato de suelo de ensayo, utilizando un dispositivo adecuado (tubo de barrena, etc.). Se cubre el fondo del tubo con un trozo de papel de filtro y, después de llenarlo con agua, se coloca en un soporte en un baño de agua. El tubo debe sumergirse gradualmente hasta que el nivel del agua esté por encima del extremo superior del suelo. A continuación, se debe dejar en el agua alrededor de tres horas. Dado que no puede retenerse toda el agua absorbida por los capilares del suelo, la muestra de suelo debe dejarse escurrir durante un período de dos horas, colocando el tubo en un lecho de arena de cuarzo finamente molida muy húmeda y contenida en un recipiente cerrado (para evitar que se seque). Después, la muestra debe pesarse y secarse hasta obtener una masa constante a 105 °C. La capacidad de retención de agua (WHC) puede calcularse entonces de la manera siguiente:

$$\text{WHC (en porcentaje de masa seca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

donde:

S = masa del sustrato saturado de agua + masa del tubo + masa del papel de filtro

T = tara (masa del tubo + masa del papel de filtro)

D = masa seca del sustrato

BIBLIOGRAFÍA:

ISO (Organización Internacional de Normalización) (1996). Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes sobre las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción, nº 11268-2. ISO, Ginebra.

▼M6

*Apéndice 3*

**Determinación del pH del suelo**

El siguiente método de determinación del pH de una muestra de suelo se basa en la descripción recogida en la norma ISO 10390 (Calidad del suelo. Determinación del pH).

Una determinada cantidad de suelo se seca a temperatura ambiente durante al menos 12 horas. A continuación se hace una suspensión del suelo (con al menos 5 gramos de este) en cinco veces su volumen de una solución 1 M de cloruro de potasio de grado analítico (KCl) o de una solución 0,01 M de cloruro de calcio de grado analítico ($CaCl_2$). La suspensión se agita enérgicamente durante cinco minutos. Después de agitarla, se deja reposar la suspensión desde 2 horas como mínimo hasta 24 horas como máximo. El pH de la fase líquida se mide a continuación utilizando un pH-metro, que habrá sido calibrado antes de cada medición con una serie adecuada de soluciones amortiguadoras (p. ej., a un pH de 4,0 y 7,0).

BIBLIOGRAFÍA:

ISO (Organización Internacional de Normalización) (1994). Calidad del suelo, Determinación del pH, nº 10390. ISO, Ginebra.

▼M6

*Apéndice 4*

**Condiciones de cultivo de *Enchytraeus* sp.**

Los enquitreidos de la especie *Enchytraeus albidus* (así como otras especies de *Enchytraeus*) pueden cultivarse en grandes cajas de plástico (p. ej., de 30 × 60 × 10 cm) rellenas de una mezcla 1:1 de suelo artificial y de suelo de jardín natural sin contaminar. Debe evitarse el material compostado, ya que podría contener sustancias tóxicas, como metales pesados. Hay que eliminar la fauna del suelo antes de su utilización (p. ej., mediante congelación). También puede utilizarse un sustrato que incluya solamente suelo artificial, pero la tasa de reproducción podría ser menor que la obtenida con un sustrato de suelo mixto. El sustrato utilizado para el cultivo debe tener un pH de 6,0 ± 0,5.

El cultivo se mantiene en la oscuridad a una temperatura de 15 a 20 °C ± 2 °C. Deben evitarse las temperaturas superiores a 23 °C. El suelo debe estar húmedo, pero no empapado. El contenido de humedad del suelo es correcto si aparecen gotitas de agua entre los dedos al apretar un puñado de suelo suavemente con la mano. Hay que evitar la aparición de condiciones anóxicas velando por que las tapas de los recipientes de cultivo permitan un adecuado intercambio de gases con la atmósfera. Hay que remover el suelo cuidadosamente cada semana, para facilitar la aireación.

Los gusanos pueden alimentarse de copos de avena. La avena debe conservarse en recipientes herméticamente cerrados y tratados en el autoclave o calentados antes de su utilización, para evitar su infestación por ácaros de la harina (p. ej., *Glyzyphagus* sp., *Astigmata, Acarina*) o ácaros depredadores [p. ej., *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles, Gamasida, Acarina*]. Después del tratamiento térmico, el producto debe molerse de forma que sea fácil de espolvorear sobre la superficie del suelo. De vez en cuando, los copos de avena pueden completarse mediante la adición de vitaminas, leche y aceite de hígado de bacalao. Otras posibles fuentes de alimento son la levadura de panadería o la comida para peces «Tetramin».

El alimento se aporta aproximadamente dos veces por semana. Se reparte una cantidad apropiada de copos de avena por la superficie del suelo o se introduce cuidadosamente en el sustrato cuando se remueve el suelo para facilitar su aireación. La cantidad absoluta de alimentos aportados depende del número de gusanos presente en el soporte. A título indicativo, la cantidad de alimentos debe incrementarse si se consume íntegramente en el plazo de un día desde que se aporta. Por el contrario, debe reducirse si sigue habiendo alimentos en la superficie en el momento de la segunda aportación (una semana más tarde). Los alimentos contaminados con crecimiento de hongos deben retirarse y sustituirse. Al cabo de tres meses, los gusanos se deben transferir a un sustrato recién preparado.

Se considera que las condiciones de cultivo son satisfactorias si los gusanos: a) no intentan salir del sustrato de suelo, b) se mueven rápidamente por el suelo, c) muestran una superficie externa brillante sin partículas de suelo adheridas, d) son de color más o menos blanquecino, e) presentan diversas bandas de edad en los cultivos, y f) se reproducen continuamente.

▼M6

*Apéndice 5*

**Realización del ensayo con otras especies de *Enchytraeus***

**Selección de las especies**

Pueden utilizarse especies distintas de *E. albidus*, pero el procedimiento de ensayo y los criterios de validez deberán adaptarse en consecuencia. Como muchas especies de *Enchytraeus* pueden conseguirse con facilidad y mantenerse satisfactoriamente en el laboratorio, el criterio más importante para seleccionar una especie distinta de *E. albidus* es la pertinencia ecológica y, de forma adicional, la sensibilidad comparable. También puede haber razones oficiales para un cambio de especies. Por ejemplo, en los países en que no esté presente *E. albidus* y no pueda importarse (debido, por ejemplo, a restricciones cuarentenarias), será necesario recurrir a otra especie de *Enchytraeus*.

**Ejemplos de especies alternativas adecuadas**

— *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe 1992): En los últimos años se está utilizando esta especie con frecuencia en estudios ecotoxicológicos debido a la simplicidad de su cría y de sus ensayos. Sin embargo, es pequeña, lo que hace que sea más difícil de manejar que *E. albidus* (especialmente en las fases previas a la utilización del método de tinción). No se ha determinado con certeza si *E. crypticus* existe en el campo, ya que solo se ha descrito a partir de cultivos de lombrices de tierra. Por lo tanto, no se conocen sus requisitos ecológicos.

— *Enchytraeus buchholzi* (Vejdovsky 1879): Esta denominación cubre probablemente un grupo de especies estrechamente emparentadas que son difíciles de distinguir morfológicamente. No se recomienda su uso en el ensayo mientras no puedan identificarse los individuos utilizados en un ensayo a nivel de especie. *E. buchholzi* se encuentra generalmente en praderas y lugares alterados, como las cunetas.

— *Enchytraeus luxuriosus*: Esta especie fue conocida inicialmente como *E. «minutus»*, pero se ha descrito recientemente (1). Fue descubierta en primer lugar por U. Graefe (Hamburgo) en una pradera próxima a St. Peter-Ording (Schleswig-Holstein, Alemania). *E. luxuriosus* tiene un tamaño aproximadamente la mitad del de *E. albidus* pero es mayor que las demás especies que se comentan en este documento; por ello puede constituir una buena alternativa a *E. albidus*.

— *Enchytraeus bulbosus* (Nielsen & Christensen 1963): Esta especie se ha comunicado hasta la fecha procedente de suelos minerales alemanes y españoles, en los que es habitual, pero no suele ser muy abundante. En comparación con otras especies pequeñas de este género, es relativamente fácil de determinar. No se sabe nada de su comportamiento en ensayos de laboratorio ni de su sensibilidad a las sustancias. No obstante, se ha comprobado que es fácil de cultivar (E. Belotti, comunicación personal).

**Condiciones de cría**

Todas las especies de *Enchytraeus* arriba mencionadas pueden cultivarse en los mismos sustratos que se utilizan para *E. albidus*. Su menor tamaño hace que los recipientes de cultivo puedan ser más pequeños y que, si bien pueden utilizarse los mismos alimentos, el tamaño de la ración deba adaptarse. El ciclo de vida de esta especie es más corto que el de *E. albidus* y el aporte de alimentos debe llevarse a cabo con mayor frecuencia.

**Condiciones del ensayo**

Las condiciones del ensayo son generalmente las mismas que en el caso de *E. albidus*, salvo que:

— el recipiente de ensayo puede ser más pequeño (aunque no es necesario);

— la duración del ensayo de reproducción puede ser más reducida (aunque no es necesario), es decir, puede ser de cuatro en vez de seis semanas; sin embargo, la duración del ensayo de determinación del intervalo no debe modificarse;

— teniendo en cuenta el pequeño tamaño de los gusanos juveniles, se recomienda encarecidamente el uso del método de tinción para el recuento;

— el criterio de validez relativo al «número de juveniles por recipiente de ensayo en el control» se ha cambiado a «50».

▼**M6**

BIBLIOGRAFÍA

(1) Schmelz, R.M. and Collado, R. (1999). Enchytraeus luxuriosus sp.nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). Chem 57, 93-100.

▼M6

*Apéndice 6*

**Descripción detallada de las técnicas de extracción**

**Tinción con rojo de Bengala**

Este método, desarrollado originalmente en ecología lacustre (1), fue propuesto por primera vez para el recuento de juveniles de enquitreidos en el ensayo de reproducción de Enchytraeidae de W. de Coen (Universidad de Gante, Bélgica). Independientemente, el RIVM de Bilthoven desarrolló una versión modificada (rojo de Bengala mezclado con formaldehído en lugar de etanol) (2) (3).

Al final del ensayo definitivo (es decir, al cabo de seis semanas), el suelo de los recipientes de ensayo se transfiere a un recipiente poco profundo. Un recipiente Bellaplast o una cubeta de revelado fotográfico con el fondo acanalado es de utilidad para este propósito, en el segundo caso porque los «canales» restringen el movimiento de los gusanos dentro del campo de observación. Los juveniles se fijan con etanol (unos 5 ml por réplica). Los recipientes se llenan a continuación con agua hasta formar una capa de 1 a 2 cm. Se añaden unas gotas (de 200 a 300 µl) de solución de rojo de Bengala (solución al 1 % en etanol) (en su lugar puede utilizarse eosina al 0,5 %) y se mezclan cuidadosamente los dos componentes. Después de 12 horas, los gusanos deben estar teñidos de color rojizo y ser fáciles de contar porque estarán en la superficie del sustrato. Otra posibilidad es lavar la mezcla de sustrato/alcohol a través de un tamiz (luz de malla: 0,250 mm) antes de proceder al recuento de los gusanos. Mediante este procedimiento, la caolinita, la turba y parte de la arena se eliminarán con el lavado y será más fácil ver y contar los gusanos de color rojizo. El uso de lentes iluminadas (tamaño de la lente de 100 x 75 mm como mínimo, con un factor de ampliación de 2 a 3x) también facilita el recuento.

La técnica de tinción reduce el tiempo del recuento a unos pocos minutos por recipiente y, como orientación, debe ser posible que una persona evalúe todos los recipientes procedentes de un ensayo en un máximo de dos días.

**Extracción por vía húmeda**

La extracción por vía húmeda debe iniciarse inmediatamente una vez finalizado el ensayo. El suelo de cada recipiente de ensayo se coloca en un tamiz de plástico con una luz de malla de 1 mm aproximadamente. A continuación, los tamices se suspenden en cubetas de plástico, sin tocar el fondo. Las cubetas se llenan cuidadosamente con agua hasta que las muestras de los tamices queden completamente por debajo de la superficie del agua. A fin de garantizar una tasa de recuperación superior al 90 % de los gusanos presentes, debe utilizarse un período de extracción de 3 días a 20 ± 2 °C. Al final del período de extracción se retiran los tamices y el agua (a excepción de un pequeño volumen) se decanta lentamente, teniendo cuidado de no alterar el sedimento que se encuentra en el fondo de las cubetas. A continuación, se agitan ligeramente las cubetas de plástico para suspender el sedimento en el agua sobrenadante. El agua se transfiere a una placa de Petri y, después de que hayan sedimentado las partículas del suelo, los enquitreidos pueden identificarse, retirarse y contarse utilizando un microscopio estereoscópico y pinzas flexibles de acero.

**Flotación**

En una nota presentada por R. Kuperman se describe un método basado en la flotación (4). Tras fijar con etanol el contenido de un recipiente de ensayo, se cubre el suelo con Ludox (sílice coloidal AM-30, suspensión en agua al 30 % en peso) hasta formar una capa de 10 a 15 mm por encima de la superficie del suelo. Después de mezclar bien el suelo con el agente de flotación durante 2-3 minutos, pueden contarse fácilmente los gusanos juveniles que flotan en la superficie.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Korinkova, J. and Sigmund, J. (1968). The colouring of bottom-fauna samples before sorting, Vestnik Ceskoslovensko Spolecnosti Zoologicke 32, 300-305.

▼**M6**

(2) Dirven-Van Breemen, E., Baerselmann, R. and Notenboom, J. (1994). Onderzoek naar de Geschiktheid van de Potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Annelida) in Bodemecotoxicologisch Onderzoek. RIVM Rapport Nr. 719102025. 46 pp.

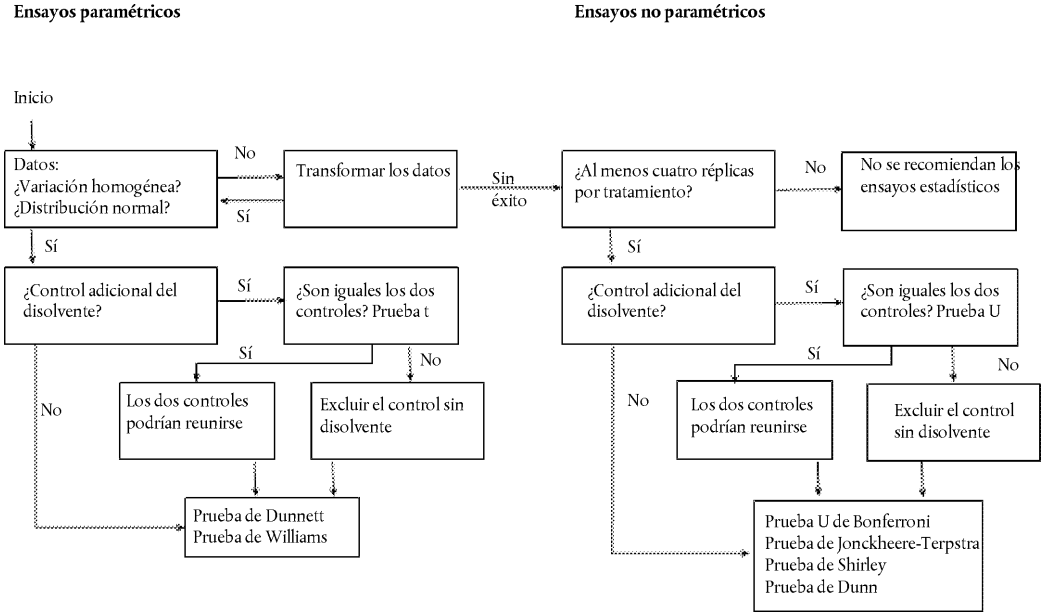
(3) Posthuma, L., Baerselmann, R., Van Veen, R.P.M. and Dirven-Van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soils. Ecotox. Envir. Safety 38, 108-121.

(4) Phillips, C.T., Checkai, R.T. and Kuperman, R.G. (1998). An alternative to the O'Connor Method for Extracting Enchytraeids from Soil. SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte, EE.UU. Abstract Book No. PMP069, p. 157.

▼**M6**

*Apéndice 7*

**Resumen de la evaluación estadística de los datos (determinación de la NOEC)**



▼M6

## C.33. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN DE LOMBRICES DE TIERRA (*EISENIA FETIDA* / *EISENIA ANDREI*)

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 222 (2004). Está diseñado para utilizarse en la evaluación de los efectos de las sustancias del suelo sobre el resultado reproductor (y otros parámetros subletales) de las especies de lombrices de tierra *Eisenia fetida* (Savigny 1826) o *Eisenia andrei* (Andre 1963) (1) (2). El ensayo ha sido objeto de un ensayo interlaboratorios (3). Ya existe un método de ensayo para el ensayo de toxicidad aguda con lombrices de tierra (4). Se ha publicado una serie de otras directrices internacionales y nacionales de ensayos de toxicidad aguda y crónica con lombrices de tierra (5) (6) (7) (8).

2. Se considera que *Eisenia fetida* y *Eisenia andrei* son representantes de la fauna del suelo y de las lombrices de tierra en particular. Se dispone de datos previos sobre la ecología de las lombrices de tierra y su utilización en ensayos ecotoxicológicos (7) (9) (10) (11) (12).

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

3. Las lombrices adultas se exponen a un intervalo de concentraciones de la sustancia problema en el suelo bien mezclada con el suelo o bien, en el caso de los plaguicidas, aplicada al interior o a la superficie de suelo mediante procedimientos coherentes con las pautas de utilización de la sustancia. El método de aplicación es específico al propósito del ensayo. El intervalo de concentraciones de ensayo se selecciona para enmarcar aquellas que pueden causar efectos tanto subletales como letales a lo largo de un período de ocho semanas. Los efectos sobre la mortalidad y sobre el crecimiento de las lombrices adultas se determinan después de cuatro semanas de exposición. A continuación, se retiran los adultos del suelo y se evalúan los efectos sobre la reproducción tras un nuevo período de cuatro semanas mediante el recuento del número de descendientes presentes en el suelo. El resultado reproductor de las lombrices expuestas a la sustancia problema se compara con el del control o controles a fin de determinar i) la concentración sin efecto observado (NOEC) y/o ii) una $EC_x$ (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{50}$) aplicando un modelo de regresión para estimar la concentración que causaría una reducción del x % del resultado reproductor. Las concentraciones de ensayo deben englobar la $EC_x$ (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{50}$) de forma que el valor de $EC_x$ se obtenga por interpolación y no por extrapolación (véanse las definiciones del apéndice 1).

### INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

4. Debe disponerse de la siguiente información relativa a la sustancia problema para facilitar el diseño de los procedimientos adecuados de ensayo:

   — hidrosolubilidad,

   — log $P_{ow}$,

   — presión de vapor,

   — y, cuando sea posible, información sobre el destino y el comportamiento en el medio ambiente (p. ej., velocidad de fotólisis y velocidad de hidrólisis en caso pertinente según las pautas de aplicación).

5. El presente método de ensayo es aplicable a todas las sustancias con independencia de su hidrosolubilidad. El método de ensayo no es aplicable a las sustancias volátiles, definidas aquí como sustancias cuya constante de Henry o cuyo coeficiente de reparto aire/agua sea superior a uno, ni a las sustancias cuya presión de vapor a 25 °C supere los 0,0133 Pa.

6. En este método de ensayo no se tiene en cuenta la posible degradación de la sustancia problema a lo largo del período de prueba. Por consiguiente, no puede suponerse que las concentraciones de exposición se van a mantener en sus valores iniciales a lo largo de todo el ensayo. En tal caso, se recomienda realizar el análisis químico de la sustancia problema al inicio y al final del ensayo.

▼M6

SUSTANCIA DE REFERENCIA

7. Deben determinarse la NOEC y/o $EC_x$ de una sustancia de referencia para ofrecer garantías de que las condiciones de ensayo del laboratorio son adecuadas y para verificar que la respuesta de los organismos de ensayo no cambia estadísticamente a lo largo del tiempo. Se recomienda efectuar un ensayo con una sustancia de referencia al menos una vez al año o, si la frecuencia de los ensayos es menor, en paralelo con la determinación de la toxicidad de una sustancia problema. La carbendazima y el benomilo son sustancias de referencia adecuadas de las que se ha visto que afectan a la reproducción (3). Deben observarse efectos significativos a concentraciones de entre a) 1 y 5 mg de principio activo (p.a.)/kg de peso seco o b) 250 y 500 g/ha o 25 y 50 $mg/m^2$. Si se incluye un patrón tóxico positivo en la serie de ensayo, se utiliza una sola concentración y el número de réplicas debe ser el mismo que el de los controles.

VALIDEZ DEL ENSAYO

8. Para que el resultado de un ensayo se considere válido, deben cumplirse los siguientes criterios en lo tocante a los controles:

— cada réplica (con 10 adultos) debe producir ≥ 30 juveniles al final del ensayo;

— el coeficiente de variación de la reproducción debe ser ≤ 30 %;

— la mortalidad de los adultos durante las primeras cuatro semanas de la prueba debe ser ≤ 10 %.

Cuando un ensayo no cumpla los criterios de validez arriba indicados, el ensayo debe interrumpirse, salvo que pueda aportarse una justificación para continuar con él. La justificación deberá incluirse en el informe.

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

**Equipo**

9. Deben utilizarse recipientes de ensayo hechos de vidrio o de otro material químicamente inerte, de una capacidad aproximada de uno a dos litros. Los recipientes deben tener una sección de 200 $cm^2$ aproximadamente de superficie, de forma que se consiga una profundidad de sustrato húmedo de unos 5-6 cm al añadir de 500 a 600 g de masa seca de sustrato. El diseño de la tapa del recipiente debe permitir el intercambio de gases entre el sustrato y la atmósfera, y el acceso a la luz (p. ej., mediante una cubierta transparente perforada), y, al mismo tiempo, evitar que se escapen las lombrices. Si la cantidad de sustrato de ensayo utilizado es notablemente superior a 500 o 600 g por recipiente de ensayo, el número de lombrices debe aumentarse proporcionalmente.

10. Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

— estufa secadora;

— microscopio estereoscópico;

— pH-metro y fotómetro;

— balanzas de precisión adecuada;

— equipo adecuado para el control de la temperatura;

— equipo adecuado para el control de la humedad (no esencial si los recipientes de exposición tienen tapa);

— incubadora o pequeña sala con aire acondicionado;

— pinzas, ganchos o asas;

— baño de agua.

▼M6

**Preparación del suelo artificial**

11. En este ensayo se utiliza un suelo artificial (5) (7) con la siguiente composición (en peso seco, secado hasta peso constante a 105 °C):

— 10 % de turba esfágnea (con un pH lo más cercano posible a 5,5-6,0, sin restos vegetales visibles, finamente molida, secada hasta conseguir un contenido de humedad determinado y medido);

— 20 % de caolín (contenido de caolinita preferentemente superior al 30 por ciento);

— entre 0,3 y 1,0 % de carbonato de calcio ($CaCO_3$, pulverizado, de pureza analítica) para obtener un pH inicial de 6,0 ± 0,5;

— 70 % de arena de cuarzo secada al aire (dependiendo de la cantidad necesaria de $CaCO_3$), en su mayor parte en forma de arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm.

*Nota 1:* La cantidad necesaria de $CaCO_3$ dependerá de los componentes del sustrato del suelo, incluidos los alimentos, y debe determinarse por mediciones de submuestras del suelo inmediatamente antes del ensayo. El pH se mide en una muestra mezclada con una solución 1 M de cloruro de potasio (KCl) o una solución 0,01 M de cloruro de calcio ($CaCl_2$) (13).

*Nota 2:* El contenido de carbono orgánico del suelo artificial puede reducirse, por ejemplo rebajando el contenido de turba al 4-5 % y aumentando análogamente el contenido de arena. Con esta reducción del contenido de carbono orgánico, es posible que disminuyan las posibilidades de adsorción de la sustancia problema al suelo (carbono orgánico) y que aumente la disponibilidad de la sustancia problema para las lombrices. Se ha demostrado que *Eisenia fetida* puede ajustarse a los criterios de validez sobre la reproducción cuando se somete a ensayo en suelos de campo con un contenido menor de carbono orgánico (p. ej., del 2,7 %) (14), y la experiencia demuestra que esto también puede conseguirse en suelo artificial con un 5 % de turba. Por lo tanto, antes de utilizar un suelo de este tipo en un ensayo definitivo no es necesario demostrar que el suelo artificial permite que el ensayo cumpla los criterios de validez, a menos que el contenido de turba se reduzca más de lo especificado anteriormente.

*Nota 3:* Cuando se utiliza suelo natural en ensayos adicionales (por ejemplo, de nivel superior), deben demostrarse también la idoneidad del suelo y el respeto de los criterios de validez del ensayo.

12. Los componentes secos del suelo se mezclan a fondo (por ejemplo, en un mezclador de laboratorio de gran escala), en un lugar bien ventilado. Antes del inicio del ensayo, el suelo artificial seco se humedece, añadiéndole una cantidad suficiente de agua desionizada para obtener aproximadamente la mitad del contenido final de agua, que supone de un 40 a un 60 % de la capacidad máxima de retención de agua (correspondiente al 50 ± 10 % de humedad en masa seca). Esto producirá un sustrato que no presenta agua suelta o libre cuando se comprime en la mano. La capacidad máxima de retención de agua del suelo artificial se determina de acuerdo con los procedimientos descritos en el apéndice 2, la norma ISO 11274 (15) u otra norma equivalente de la UE.

13. Si la sustancia problema se aplica en la superficie del suelo o se introduce en este sin agua, la cantidad final de agua puede introducirse en el suelo artificial durante la preparación del suelo. Si la sustancia problema se introduce en el suelo junto con algo de agua, el agua adicional puede añadirse junto con la sustancia problema (véase el punto 19).

14. Se determina el contenido de humedad del suelo al inicio y al final del ensayo de conformidad con la norma ISO 11465 (16) u otra norma equivalente de la UE, y el pH del suelo de conformidad con el apéndice 3, la norma ISO 10390 (13) u otra norma equivalente de la UE. Estas determinaciones deben llevarse a cabo en una muestra del suelo control y en una

▼M6

muestra del suelo de cada concentración de ensayo. El pH del suelo no debe ajustarse cuando se ensayen sustancias ácidas o básicas. El contenido de humedad debe comprobarse a lo largo de todo el ensayo pesando los recipientes de manera periódica (véanse los puntos 26 y 30).

**Selección y preparación de los animales de ensayo**

15. La especie usada en el ensayo es *Eisenia fetida* o *Eisenia andrei* (1) (2). Para iniciar el ensayo es necesario disponer de lombrices adultas de entre dos meses y un año de edad y con clitelo. Las lombrices deben seleccionarse de un cultivo sincronizado con una estructura de edades relativamente homogénea (apéndice 4). Los individuos de un grupo de ensayo no deben diferir por su edad en más de cuatro semanas.

16. Las lombrices seleccionadas deben aclimatarse durante al menos un día al tipo de sustrato del suelo artificial que vaya a utilizarse en el ensayo. Durante este período deben darse a las lombrices los mismos alimentos que se vayan a utilizar en el ensayo (véanse los puntos 31 a 33).

17. Al inicio del ensayo deben pesarse individualmente las lombrices, y asignarse aleatoriamente en grupos de diez a los recipientes de ensayo. Las lombrices se lavan (con agua desionizada) antes de su pesada y se elimina el exceso de agua poniendo brevemente las lombrices sobre papel de filtro. El peso húmedo de cada lombriz debe situarse entre 250 y 600 mg.

**Preparación de las concentraciones de ensayo**

18. Pueden seguirse dos métodos de aplicación de la sustancia problema: introducción de la sustancia problema en el suelo (véanse los puntos 19 a 21) o aplicación en la superficie del suelo (véanse los puntos 22 a 24). La selección del método adecuado depende de la finalidad del ensayo. En general, se recomienda la introducción de la sustancia problema en el suelo. No obstante, puede ser necesario recurrir a procedimientos de aplicación que sean coherentes con la práctica agrícola normal (por ejemplo, pulverización de formulaciones líquidas o uso de formulaciones especiales de plaguicidas, tales como gránulos o preparaciones para semillas). Los disolventes utilizados para facilitar el tratamiento del suelo con la sustancia problema deben seleccionarse sobre la base de su baja toxicidad para las lombrices de tierra y debe incluirse en el diseño del ensayo un control adecuado de los disolventes (véase el punto 27).

**Introducción de la sustancia problema en el suelo**

*Sustancia problema hidrosoluble*

19. Inmediatamente antes del inicio del ensayo, se prepara una solución de la sustancia problema en agua desionizada, en cantidad suficiente para todas las réplicas de una misma concentración. Puede ser necesario recurrir a un cosolvente para facilitar la preparación de la solución de ensayo. Es conveniente preparar la cantidad de solución necesaria para alcanzar el contenido final de humedad (del 40 al 60 % de la capacidad máxima de retención de agua). La solución se mezcla a fondo con el sustrato del suelo antes de introducirla en un recipiente de ensayo.

*Sustancia problema no hidrosoluble*

20. La sustancia problema se disuelve en una pequeña cantidad de un disolvente orgánico apropiado (p. ej., acetona) y, a continuación, se rocía sobre una pequeña cantidad de arena de cuarzo fina o se mezcla con esta. El disolvente se elimina por evaporación bajo una campana extractora durante al menos unos minutos. La arena tratada se mezcla entonces bien con el suelo artificial prehumedecido. A continuación se añade el volumen necesario de agua desionizada para alcanzar un contenido final de humedad del 40 al 60 % de la capacidad máxima de retención de agua, y se mezcla bien. El suelo queda así listo para ponerse en los recipientes de ensayo. Debe tenerse cuidado con la posibilidad de que algunos disolventes sean tóxicos para las lombrices de tierra.

▼M6

*Sustancia problema insoluble en agua y en disolventes orgánicos*

21. Se prepara una mezcla de 10 g de arena de cuarzo industrial finamente molida con la cantidad de sustancia problema necesaria para obtener la concentración de ensayo en el suelo. Esta mezcla se mezcla bien a su vez con el suelo artificial prehumedecido. A continuación se añade el volumen necesario de agua desionizada para alcanzar un contenido final de humedad del 40 al 60 % de la capacidad máxima de retención de agua, y se mezcla bien. El suelo queda así listo para ponerse en los recipientes de ensayo.

*Aplicación de la sustancia problema en la superficie del suelo*

22. El suelo se trata después de haberse añadido las lombrices. Los recipientes de ensayo se llenan primero con el sustrato de suelo humedecido y las lombrices pesadas se colocan en la superficie. Las lombrices sanas se entierran normalmente de forma inmediata en el interior del sustrato y, por consiguiente, las lombrices que queden en la superficie al cabo de 15 minutos se definen como dañadas y deben sustituirse. Si se sustituyen lombrices, deben pesarse las nuevas y las sustituidas, de forma que se conozca el peso vivo total del grupo de lombrices de exposición y el peso total del recipiente con las lombrices al comienzo.

23. Se aplica la sustancia problema. No debe añadirse al suelo antes de que haya pasado media hora desde la introducción de las lombrices (o si sigue habiendo lombrices en la superficie del suelo), a fin de evitar la exposición directa a la sustancia problema por contacto con la piel. Si la sustancia problema es un plaguicida, puede ser conveniente aplicarla a la superficie del suelo por rociado. La sustancia problema debe aplicarse a la superficie del suelo de la manera más uniforme posible, utilizando un dispositivo de rociado de laboratorio adecuado para simular la aplicación por rociado en el campo. Antes de la aplicación, debe retirarse la tapa del recipiente de ensayo y sustituirse por un forro que proteja las paredes del recipiente frente al aerosol. El forro puede consistir en un recipiente de ensayo al que se ha retirado el fondo. La aplicación debe efectuarse a una temperatura de 20 ± 2 °C y, en el caso de las soluciones, emulsiones o dispersiones acuosas, la tasa de aplicación de agua será de entre 600 y 800 $\mu l/m^2$. La tasa de aplicación debe comprobarse utilizando una técnica de calibración apropiada. Las formulaciones especiales, como gránulos o preparaciones para semillas, deben aplicarse de forma coherente con la utilización agrícola.

24. Los recipientes de ensayo deben quedar descubiertos durante una hora para que puedan evaporarse los eventuales disolventes volátiles asociados con la aplicación de la sustancia problema. Debe tenerse cuidado para que en ese tiempo no se escapen las lombrices de los recipientes de ensayo.

PROCEDIMIENTO

**Grupos de ensayo y controles**

25. Se recomienda una carga de 10 lombrices de tierra en 500 — 600 g de peso seco de suelo artificial (es decir, 50 a 60 g de suelo por lombriz). Si se utilizan cantidades mayores de suelo, como podría ser el caso si se ensayan plaguicidas con modos de aplicación especiales, tales como preparaciones para semillas, debe mantenerse la carga de 50 - 60 g de suelo por lombriz aumentando el número de lombrices. Se preparan diez lombrices para cada recipiente de control y de tratamiento. Las lombrices se lavan con agua y se escurren; después se ponen en papel absorbente durante un breve período para eliminar el exceso de agua.

26. A fin de evitar errores sistemáticos en la distribución de las lombrices entre los recipientes de ensayo, la homogeneidad de la población de estudio debe determinarse pesando individualmente 20 lombrices muestreadas aleatoriamente de la población de la que deben tomarse las lombrices de ensayo. Una vez garantizada la homogeneidad, los lotes de lombrices se seleccionan, se pesan, y se asignan a los recipientes de ensayo utilizando un procedimiento de aleatorización. Tras la adición de las lombrices de ensayo, debe

▼M6

medirse el peso de cada recipiente de ensayo a fin de asegurarse de que hay un peso inicial que puede utilizarse como base para el control del contenido de humedad del suelo a lo largo de todo el ensayo, como se describe en el punto 30. Los recipientes de ensayo se cubren entonces, como se describe en el punto 9, y se colocan en la cámara de ensayo.

27. Se preparan controles adecuados para cada uno de los métodos de aplicación de la sustancia problema descritos en los puntos 18 a 24. Para preparar los controles se siguen los procedimientos pertinentes descritos, salvo que no se añade la sustancia problema. Por lo tanto, en su caso, se utilizan en los controles disolventes orgánicos, arena de cuarzo u otros vehículos, en concentraciones y cantidades iguales a las utilizadas en los tratamientos. Cuando se utiliza un disolvente u otro vehículo para añadir la sustancia problema, debe prepararse y someterse a ensayo un control adicional sin sustancia problema y sin vehículo para asegurarse de que el vehículo no tiene ninguna incidencia sobre el resultado.

**Condiciones del ensayo**

28. La temperatura de ensayo es de 20 ± 2 °C. El ensayo se efectúa en ciclos controlados de luz y oscuridad (preferentemente 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con una iluminación de 400 a 800 lux en la zona de los recipientes de ensayo.

29. Los recipientes de ensayo no se airean durante el ensayo, pero el diseño de las tapas de los recipientes de ensayo debe permitir los intercambios gaseosos, al tiempo que limita la evaporación de la humedad (véase el punto 9).

30. Se controla que el contenido de agua del sustrato del suelo en los recipientes de ensayo se mantenga constante a lo largo de todo el ensayo, pesando periódicamente los recipientes de ensayo (menos sus tapas). Las pérdidas se compensan en la medida de lo necesario con agua desionizada. El contenido de agua no debe variar en más de un 10 % respecto al del inicio del ensayo.

**Alimentación**

31. Se considera aceptable cualquier alimento del que se haya demostrado que tiene una calidad adecuada para al menos mantener el peso de las lombrices durante el ensayo. La experiencia ha demostrado que la harina de avena y el estiércol de caballo o de vaca son un alimento adecuado. Se deben realizar controles para garantizar que las vacas o caballos de los que se obtiene el estiércol no son objeto de tratamiento con medicamentos o sustancias, tales como factores de crecimiento, nematicidas o productos veterinarios similares, que puedan afectar negativamente a las lombrices durante el ensayo. Se recomienda recoger directamente el estiércol de vaca, ya que la experiencia ha demostrado que el estiércol de vaca disponible en el comercio para utilizarse como abono de jardín puede tener efectos negativos para las lombrices. El estiércol debe secarse al aire, molerse finamente y pasteurizarse antes de su utilización.

32. Cada lote nuevo de alimentos debe darse a un cultivo de lombrices aparte antes de su utilización en un ensayo para asegurarse de que es de calidad aceptable. El crecimiento y la producción de capullos no deben reducirse respecto a las lombrices mantenidas en un sustrato que no contiene el nuevo lote de alimentos [en las condiciones descritas en el método de ensayo C.8 (4)].

33. Se facilita alimentación por primera vez un día después de la adición de las lombrices y la aplicación de la sustancia problema al suelo. Aproximadamente 5 g de alimento se reparten por la superficie del suelo de cada recipiente y se humedecen con agua desionizada (unos 5 o 6 ml por recipiente). Posteriormente, se suministra el alimento una vez por semana durante el período de ensayo de cuatro semanas. Si quedan alimentos sin

▼M6

consumir, debe reducirse la ración alimentaria con el fin de evitar el crecimiento de hongos o enmohecimiento. Los adultos se retiran del suelo el día 28 del ensayo. A continuación se administran otros 5 g de alimento a cada recipiente de ensayo. No se vuelve a aportar alimento durante las cuatro semanas restantes del ensayo.

**Selección de las concentraciones de ensayo**

34. El conocimiento previo de la toxicidad de la sustancia problema debe ayudar a la hora de seleccionar las concentraciones de ensayo apropiadas, por ejemplo gracias a un ensayo de toxicidad aguda (4) o a un estudio de determinación del intervalo. Cuando sea necesario, se llevará a cabo un ensayo de determinación del intervalo con, por ejemplo, cinco concentraciones de ensayo, de 0,1, 1,0, 10, 100 y 1 000 mg/kg (peso seco de suelo). Es suficiente con una sola réplica para cada tratamiento y control. La duración del ensayo de determinación del intervalo es de dos semanas y al final del mismo se evalúa la mortalidad.

**Diseño experimental**

35. Al no poder prescribir para el ensayo la aplicación de un único valor muestral que sirva de resumen, este método de ensayo prevé la determinación de la NOEC y la $EC_x$. Es probable que las autoridades reguladoras exijan la NOEC en un futuro previsible. En el futuro inmediato es posible que se adopte una utilización más amplia de la $EC_x$, como consecuencia de consideraciones estadísticas y ecológicas. Por tanto, se proponen tres diseños sobre la base de las recomendaciones derivadas de una prueba interlaboratorios realizada sobre un método de ensayo de reproducción de enquitreidos (17).

36. Al determinar la gama de concentraciones, debe tenerse en cuenta lo siguiente:

— para la determinación de la NOEC deben someterse a ensayo al menos cinco/doce concentraciones en serie geométrica; se recomienda utilizar cuatro réplicas de cada concentración de ensayo más ocho controles; las concentraciones deben estar espaciadas por un factor que no exceda de 2,0;

— para la determinación de los valores de $EC_x$ (por ejemplo, $EC_{10}$, $EC_{50}$), se recomienda un número adecuado de concentraciones que causen al menos cuatro respuestas medias significativamente diferentes desde el punto de vista estadístico a estas concentraciones; se recomienda utilizar al menos dos réplicas de cada concentración de ensayo y seis réplicas de control; el factor de espaciado puede variar, es decir, ser igual o inferior a 1,8 en el intervalo de efecto previsto y superior a 1,8 a concentraciones superiores e inferiores;

— un enfoque combinado permite la determinación tanto de la NOEC como de la $EC_x$; deben utilizarse ocho concentraciones de tratamiento en progresión geométrica; se recomienda utilizar cuatro réplicas de cada tratamiento más ocho controles; las concentraciones deben estar espaciadas por un factor que no exceda de 1,8.

**Duración del ensayo y mediciones**

37. El día 28 se observan y recuentan las lombrices adultas vivas. También debe registrarse cualquier anomalía que se observe en el comportamiento (por ejemplo, si se vuelven incapaces de excavar en el suelo o si se quedan inmóviles) y en la morfología (por ejemplo, heridas abiertas). A continuación, se retiran y se pesan todas las lombrices adultas de los recipientes de ensayo. La transferencia del suelo que contiene las lombrices a una bandeja limpia antes de la evaluación puede facilitar la búsqueda de las lombrices adultas. Las lombrices extraídas del suelo deben lavarse (con agua desionizada) antes de pesarse y se elimina el exceso de agua poniendo brevemente las lombrices en papel de filtro. Las eventuales lombrices que no se encuentren en esta fase se registrarán como muertas, ya que es de suponer que estas lombrices hayan muerto y se hayan descompuesto antes de la evaluación.

▼M6

38. Si el suelo se ha retirado de los recipientes, ahora se devuelve a ellos (sin las lombrices adultas, pero todavía con los eventuales capullos producidos). El suelo se incuba a continuación durante cuatro semanas adicionales en las mismas condiciones de ensayo, salvo que la alimentación solo tiene lugar una vez al comienzo de esta fase del ensayo (véase el punto 33).

39. Al final del segundo período de cuatro semanas, se determinan el número de juveniles nacidos de los capullos en el suelo de ensayo y el número de capullos, mediante los procedimientos descritos en el apéndice 5. También deben registrarse a lo largo del ensayo todos los signos de daño o deterioro de las lombrices.

**Ensayo límite**

40. Si no se observan efectos a la concentración máxima utilizada en el ensayo de determinación del intervalo (es decir, 1 000 mg/kg), el ensayo de reproducción se realizaría como ensayo límite, con una concentración de ensayo de 1 000 mg/kg. El ensayo límite ofrecerá la oportunidad de demostrar que la NOEC para la reproducción es superior a la concentración límite, reduciendo al mínimo el número de lombrices utilizadas en el ensayo. Deben utilizarse ocho réplicas tanto para el suelo tratado como para el control.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

41. A pesar de que se da una visión de conjunto en el apéndice 6, en este método de ensayo no se incluye ninguna orientación estadística definitiva para el análisis de los resultados del ensayo.

42. Un parámetro es la mortalidad. Sin embargo, también deben registrarse los cambios en el comportamiento (por ejemplo, si se vuelven incapaces de excavar en el suelo o si se quedan inmóviles junto a la pared de vidrio del recipiente de ensayo) y en la morfología (p. ej., si tienen heridas abiertas) de las lombrices adultas, además de la eventual presencia de juveniles. Para determinar la $LC_{50}$ debe aplicarse en principio el análisis de probit (18) o la regresión logística. No obstante, en aquellos casos en que este método de análisis no sea adecuado (por ejemplo, si se dispone de menos de tres concentraciones con mortalidades parciales) pueden utilizarse métodos alternativos. Entre estos métodos pueden figurar el de medias móviles (19), el método de Spearman-Karber recortado (20) o una interpolación simple (p. ej., media geométrica de $LC_0$ y $LC_{100}$, calculada multiplicando la raíz cuadrada de $LC_0$ por $LC_{100}$).

43. El otro parámetro es la fecundidad (es decir, el número de juveniles producidos). Sin embargo, como en el ensayo de determinación del intervalo, deben registrarse en el informe final todos los demás signos de naturaleza nociva. El análisis estadístico requiere que se calculen la media aritmética $\overline{x}$ y la desviación típica por grupo de tratamiento y por grupo de control en cuanto a la reproducción.

44. Si se ha realizado el análisis de la varianza, la desviación típica, s, y los grados de libertad, df, pueden sustituirse respectivamente por la estimación de la varianza «agrupada» obtenida del ANOVA y por sus grados de libertad, siempre que la varianza no dependa de la concentración. En este caso, se utilizarán las distintas varianzas de los controles y de los grupos tratados. Estos valores son calculados en general por programas estadísticos comerciales utilizando los resultados de cada recipiente como réplicas. Si la «agrupación» de datos de los controles negativo y de disolvente parece más razonable que hacer las pruebas frente a uno solo de estos conjuntos, debe comprobarse que no son significativamente diferentes (sobre pruebas apropiadas véanse el punto 47 y el apéndice 6).

45. La realización de más pruebas estadísticas y de deducciones depende de si los valores de las réplicas se distribuyen normalmente y son homogéneas en lo que respecta a su varianza.

▼M6

**Estimación de la NOEC**

46. Es preferible la aplicación de ensayos potentes. Se debería utilizar la información previa obtenida, por ejemplo a partir de la experiencia con ensayos interlaboratorios u otros datos históricos, sobre si los datos presentan una distribución aproximadamente normal. Es más crítica la homogeneidad de la varianza (homoscedasticidad). La experiencia indica que la varianza suele aumentar cuando sube la media. En estos supuestos, una transformación de los datos podría llevar a la homoscedasticidad. Sin embargo, esta transformación debe basarse en la experiencia con datos históricos, más que en los datos objeto de la investigación. Con datos homogéneos, deben llevarse a cabo pruebas t de comparación múltiple, como la prueba de Williams ($\alpha$ = 0,05, unilateral) (21) (22) o, en algunos casos, la prueba de Dunnett (23) (24). Cabe señalar que, en caso de replicación desigual, los valores t del cuadro deberán corregirse según lo sugerido por Dunnett y Williams. En ocasiones, debido a una gran variación, las respuestas no aumentan o disminuyen regularmente. En este caso de fuerte desviación respecto a la monotonicidad, es más conveniente la prueba de Dunnett. En caso de que haya desviaciones con respecto a la homoscedasticidad, puede resultar razonable analizar más estrechamente los posibles efectos sobre las varianzas, a fin de decidir si las pruebas t pueden aplicarse sin perder mucha potencia (25). De forma alternativa, puede aplicarse una prueba U de comparación múltiple, por ejemplo la prueba U de Bonferroni según Holm (26), o, cuando estos datos presenten heteroscedasticidad pero por lo demás sean coherentes con una relación dosis-respuesta monótona subyacente, otra prueba no paramétrica [por ejemplo, una prueba de Jonckheere-Terpstra (27) (28) o Shirley (29) (30)] y, en general, se dará preferencia a estas pruebas frente a las pruebas t de varianza desigual (véase también el esquema del apéndice 6).

47. En caso de que se haya realizado un ensayo límite y se cumplan los requisitos previos de procedimientos de ensayos paramétricos (normalidad, homogeneidad), puede utilizarse la prueba t de Student pareada o, si no, el procedimiento de la prueba U de Mann-Whitney (31).

**Estimación de $EC_x$**

48. Para calcular cualquier valor de $EC_x$ se utilizan las medias por tratamiento para el análisis de regresión (lineal o no lineal), tras haber obtenido una función dosis-respuesta adecuada. En relación con el crecimiento de las lombrices como respuesta continua, pueden calcularse los valores de $EC_x$ utilizando el análisis de regresión adecuado (32). Entre las funciones adecuadas para los datos cuánticos (mortalidad/supervivencia) y número de descendientes producidos están las funciones sigmoideas normales, logísticas o de Weibull, con entre dos y cuatro parámetros, algunas de las cuales pueden modelizar también respuestas horméticas. Si la función dosis-respuesta se ha ajustado mediante análisis de regresión lineal, debe determinarse con el análisis de regresión un $r^2$ (coeficiente de determinación) y/o una pendiente significativos antes de estimar la $EC_x$ mediante la inserción de un valor correspondiente a x % de la media del control en la ecuación encontrada con el análisis de regresión. Se calculan límites de confianza del 95 % con arreglo al método de Fieller [citado en Finney (18)] u otros métodos adecuados modernos.

49. Otra posibilidad consiste en modelizar la respuesta como porcentaje o proporción del parámetro del modelo que se interpreta como la respuesta media del control. En estos casos, la curva sigmoidea normal (logística, Weibull) puede ajustarse a menudo fácilmente a los resultados utilizando el método de regresión de probit (18). En estos casos, la función de ponderación ha de ajustarse para respuestas métricas según indica Christensen (33). No obstante, si se ha observado hormesis, el análisis de probit debe ser sustituido por una función logística o de Weibull de cuatro parámetros, ajustada por un método de regresión no lineal (34). Si no puede ajustarse a los datos una función dosis-respuesta adecuada, podrán utilizarse métodos alternativos para calcular el valor de $EC_x$ y sus límites de confianza, tales como el método de medias móviles de Thompson (19) y el de Spearman-Karber recortado (20).

INFORME DEL ENSAYO

50. El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

▼**M6**

*Sustancia problema:*

— descripción definitiva de la sustancia problema, lote de fabricación, lote de acondicionamiento y número CAS, pureza;

— propiedades de la sustancia problema (p. ej., log $K_{ow}$, hidrosolubilidad, presión de vapor, constante de Henry (H) e información sobre el destino y el comportamiento).

*Organismos de ensayo:*

— animales utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría,

— edad, intervalo de tamaños (masas) de los organismos de ensayo.

*Condiciones del ensayo:*

— datos de la preparación del suelo para el ensayo;

— capacidad máxima de retención de agua del suelo;

— descripción de la técnica utilizada para aplicar la sustancia problema al suelo;

— datos de las sustancias auxiliares utilizadas para la administración de la sustancia problema;

— datos de calibrado para el equipo de rociado, si procede;

— descripción del diseño experimental y del procedimiento;

— tamaño de los recipientes de ensayo y volumen del suelo de ensayo;

— condiciones del ensayo: intensidad luminosa, duración de los ciclos de luz y oscuridad, temperatura;

— descripción del régimen alimentario, tipo y cantidad del alimento utilizado en el ensayo, fechas de alimentación;

— pH y contenido de agua del suelo al inicio y al final del ensayo.

*Resultados del ensayo:*

— mortalidad de los adultos (%) en cada recipiente de ensayo al final de las cuatro primeras semanas del ensayo;

— masa total de los adultos al comienzo del ensayo en cada recipiente de ensayo;

— cambios en el peso corporal de los adultos vivos (% del peso inicial) de cada recipiente de ensayo tras las cuatro primeras semanas del ensayo;

— número de juveniles producidos en cada recipiente de ensayo al final del ensayo;

— descripción de los síntomas manifiestos o patológicos, o de los cambios claros de comportamiento;

— resultados obtenidos con la sustancia de referencia;

— la $LC_{50}$, la NOEC y/o $EC_x$ (p. ej., $EC_{50}$, $EC_{10}$) para la reproducción si algunas de ellas son aplicables con intervalos de confianza, y un gráfico del modelo ajustado utilizado para su cálculo, todas las informaciones y observaciones útiles para la interpretación de los resultados;

— representación gráfica de la relación dosis-respuesta;

— resultados aplicables a cada recipiente de ensayo;

Las eventuales desviaciones respecto a los procedimientos descritos en el presente método de ensayo y cualquier acontecimiento inusual ocurrido en el ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Jaenicke, J. (1982). «*Eisenia foetida*» is two biological species. Megadrilogica 4, 6-8.

(2) Oien, N. and J. Stenerson (1984). Esterases of earthworm — III. Electrophoresis reveals that *Eisenia foetida* (Savigny) is two species. Comp. Biochem. Physiol. 78c (2), 277 — 282.

▼**M6**

(3) Kula, C. (1996). Development of a test method on sublethal effects of pesticides on the earthworm species *Eisenia fetida/Eisenia andrei* — comparison of two ringtests. En: Riepert, F., Kula, C. (1996): Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on collembola and earthworms. Mitt. Biol. Bundesamst. f. Land- Forstwirtsch. Berlín-Dahlem, 320, p. 50-82.

(4) Capítulo C.8 del presente anexo. Ensayo de toxicidad aguda para gusanos de tierra.

(5) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1996). Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes sobre las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción, nº 11268-2. ISO, Ginebra.

(6) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1993). Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes sobre las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*). Parte 1: Determinación de la toxicidad aguda utilizando un sustrato de suelo artificial, nº 11268-1. ISO, Ginebra.

(7) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., y L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.

(8) EPA (1996). Ecological effects test guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test (850.62.00). United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. EPA712-C-96-167, April 1996.

(9) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Écologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.

(10) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Informe EUR 8714 EN, Comisión de las Comunidades Europeas.

(11) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.

(12) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, Londres.

(13) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1994). Calidad del suelo, Determinación del pH, nº 10390. ISO, Ginebra.

(14) Hund-Rinke, K, Römbke, J., Riepert, F. & Achazi R. (2000): Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. En: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 59-81.

(15) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1992). Calidad del suelo. Determinación de la característica de retención de agua. Métodos de laboratorio, nº 11274. ISO, Ginebra.

(16) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1993). Calidad del suelo. Determinación de la materia seca y del contenido en agua en términos de masa. Método gravimétrico, nº 11465. ISO, Ginebra.

(17) Römbke, J. and Th. Moser (1999). Organisation and Performance of an International Ringtest for the validation of the Enchytraeid Reproduction Test. UBA-Texte 4/99, 150+ 223 pp.

▼**M6**

(18) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

(19) Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. — Charles Griffin & Company Ltd, Londres.

(20) Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Correction Environ. Sci. Technol. 12(1998), 417.

(21) Williams, D.A., (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

(22) Williams, D.A., (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519-531.

(23) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

(24) Dunnett, C.W., (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

(25) Hoeven, N. van der, (1998). Power analysis for the NOEC: What is the probability of detecting small toxic effects on three different species using the appropriate standardized test protocols? Ecotoxicology 7: 355-361.

(26) Holm, S., (1979): A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

(27) Jonckheere, A. R. (1954); A Distribution-free k-Sample Test Against Ordered Alternatives, Biometrika 41, 133-145.

(28) Terpstra, T. J. (1952); The Asymptotic Normality and Consistency of Kendall's Test Against Trend, When Ties are Present in One Ranking, Indagationes Math. 14, 327-333.

(29) Shirley, E. A. (1979); The comparison of treatment to control group means in toxicology studies, Applied Statistics 28, 144-151.

(30) Williams, D.A. (1986); A Note on Shirley's Nonparametric Test for Comparing Several Dose Levels with a Zero-Dose Control, Biometrics 42, 183-186.

(31) Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981). Biometry. The Principle and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. Nueva York.

(32) Bruce, R.D. and Versteeg, D.J. (1992). A Statistical Procedure for Modelling Continuous Toxicity Data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485-1494.

(33) Christensen, E.R., (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18, 213-221.

(34) Van Ewijk, P.H. and J.A. Hoekstra. (1993). Calculation of the EC50 and its confidence interval when sub-toxic stimulus is present. Ecotox, Environ. Safety. 25, 25-32.

▼M6

*Apéndice 1*

**Definiciones**

En este método de ensayo se aplican las siguientes definiciones:

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**$EC_x$** (concentración con efecto al x %): concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado período de exposición cuando se compara con un control. Por ejemplo, una $EC_{50}$ es una concentración de la que se estima que causa un efecto sobre un parámetro de un ensayo en el 50 % de una población expuesta a lo largo de un determinado período de exposición. En este ensayo, las concentraciones con efecto se expresan en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo o en masa de sustancia problema por unidad de superficie del suelo.

**$LC_0$** (concentración no letal): concentración de una sustancia problema que no mata a ninguno de los organismos de ensayo expuestos dentro de un determinado período de tiempo. En este ensayo la $LC_0$ se expresa en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo.

**$LC_{50}$** (concentración letal mediana): concentración de una sustancia problema que mata al 50 % de los organismos de ensayo expuestos dentro de un determinado período de tiempo. En este ensayo, la $LC_{50}$ se expresa en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo o en masa de sustancia problema por unidad de superficie del suelo.

**$LC_{100}$** (concentración totalmente letal): concentración de una sustancia problema que mata al 100 % de los organismos de ensayo expuestos dentro de un determinado período de tiempo. En este ensayo la $LC_{100}$ se expresa en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo.

**LOEC** (concentración mínima con efecto observado): concentración mínima de la sustancia problema que tiene un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$). En este ensayo, la LOEC se expresa en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo o en masa de sustancia problema por unidad de superficie del suelo. Todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben presentar normalmente un efecto que es estadísticamente diferente del del control. Cualquier desviación respecto de lo anterior debe justificarse en el informe de ensayo.

**NOEC** (concentración sin efecto observado): concentración más elevada de la sustancia problema inmediatamente por debajo de la LOEC a la que no se observa ningún efecto. En este ensayo, la concentración correspondiente a la NOEC no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro de un determinado período de exposición en comparación con el control.

**Tasa de reproducción**: número medio de lombrices juveniles producidas por un número de lombrices adultas durante el período de ensayo.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼**M6**

*Apéndice 2*

**Determinación de la capacidad máxima de retención de agua del suelo**

Se ha comprobado que el siguiente método es adecuado para determinar la capacidad máxima de retención de agua del suelo. Se describe en el anexo C de la norma ISO DIS 11268-2 (1).

Se recoge una determinada cantidad (p. ej., 5 g) del sustrato de suelo de ensayo, utilizando un dispositivo adecuado de muestreo (tubo de barrena, etc.). Se cubre el fondo del tubo con un trozo de papel de filtro, se llena de agua y se coloca a continuación en un soporte en un baño de agua. El tubo debe sumergirse gradualmente hasta que el nivel del agua esté por encima del extremo superior del suelo. A continuación, se debe dejar en el agua alrededor de tres horas. Dado que no puede retenerse toda el agua absorbida por los capilares del suelo, la muestra de suelo debe dejarse escurrir durante un período de dos horas, colocando el tubo en un lecho de arena de cuarzo finamente molida muy húmeda y contenida en un recipiente tapado (para evitar que se seque). La muestra debe pesarse y secarse hasta obtener una masa constante a 105 °C. La capacidad de retención de agua (WHC) puede calcularse de la manera siguiente:

$$\text{WHC (en porcentaje de masa seca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

donde:

S = masa del sustrato saturado de agua + masa del tubo + masa del papel de filtro

T = tara (masa del tubo + masa del papel de filtro)

D = masa seca del sustrato

BIBLIOGRAFÍA:

(1) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1996). Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes sobre las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción, nº 11268-2. ISO, Ginebra.

▼**M6**

*Apéndice 3*

**Determinación del pH del suelo**

El siguiente método de determinación del pH de un suelo se basa en la descripción recogida en la norma ISO DIS 10390: Calidad del suelo. Determinación del pH (1).

Una determinada cantidad de suelo se seca a temperatura ambiente durante al menos 12 horas. A continuación se hace una suspensión del suelo (con al menos 5 gramos de este) en cinco veces su volumen de una solución 1 M de cloruro de potasio de grado analítico (KCl) o de una solución 0,01 M de cloruro de calcio de grado analítico ($CaCl_2$). Después de agitarla enérgicamente durante 5 minutos, se deja reposar la suspensión desde 2 horas como mínimo hasta 24 horas como máximo. El pH de la fase líquida se mide a continuación utilizando un pH-metro, que habrá sido calibrado antes de cada medición con una serie adecuada de soluciones amortiguadoras (p. ej., a un pH de 4,0 y 7,0).

BIBLIOGRAFÍA:

(1) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1994). Calidad del suelo. Determinación del pH, nº 10390. ISO, Ginebra.

▼**M6**

*Apéndice 4*

**Cultivo de *Eisenia fetida* / *Eisenia andrei***

La cría se realiza preferentemente en una cámara climatizada a 20 °C ± 2 °C. A esta temperatura y con el aporte de alimentos suficientes, las lombrices maduran al cabo de unos 2 o 3 meses.

Ambas especies pueden cultivarse con una amplia gama de residuos animales. El medio de cría recomendado es una mezcla 50:50 de estiércol de caballo o de vaca y de turba. Se deben realizar controles para garantizar que las vacas o caballos de los que se obtiene el estiércol no son objeto de tratamiento con medicamentos o sustancias, tales como factores de crecimiento, nematicidas o productos veterinarios similares, que puedan afectar negativamente a las lombrices durante el ensayo. Se recomienda recoger directamente estiércol de vaca procedente de una fuente «ecológica», ya que la experiencia ha demostrado que el estiércol disponible en el comercio para utilizarse como abono de jardín puede tener efectos negativos para las lombrices. El medio debe tener un valor de pH aproximadamente entre 6 y 7 (ajustado con carbonato de calcio) y una conductividad iónica baja (menos de 6 mS/cm o menos del 0,5 % de concentración salina), y no debe presentar una contaminación excesiva de amoníaco ni de orina animal. El sustrato debe estar húmedo, pero no demasiado mojado. Son adecuadas las cajas de cría de 10 a 50 l de capacidad.

Para obtener lombrices homogéneas en cuanto a su edad y masa, lo mejor es iniciar el cultivo con capullos. Una vez establecido el cultivo, se mantiene colocando lombrices adultas en una caja de cría con sustrato fresco durante un plazo de 14 a 28 días, a fin de permitir la producción de nuevos capullos. A continuación, se retiran los adultos, y los juveniles obtenidos de los capullos se utilizan como base para el cultivo siguiente. Las lombrices se alimentan de forma continua con residuos animales y se trasladan a sustrato fresco de vez en cuando. La experiencia ha demostrado que la harina de avena o el estiércol de caballo o de vaca finamente molido y secado al aire son un alimento adecuado. Hay que asegurarse de que las vacas o caballos de los que se obtiene el estiércol no son objeto de tratamiento con medicamentos o sustancias, tales como factores de crecimiento, que puedan afectar negativamente a las lombrices durante el cultivo a largo plazo. Las lombrices nacidas de los capullos se utilizan en los ensayos cuando tienen entre 2 y 12 meses de edad y se consideran adultas.

Puede considerarse que las lombrices están sanas si se mueven a través del sustrato, no intentan abandonarlo y se reproducen continuamente. Es signo de agotamiento del sustrato que las lombrices se muevan muy lentamente y tengan el extremo posterior de color amarillo. En este caso, se recomienda el aporte de sustrato fresco y/o una reducción de la densidad de población.

▼**M6**

*Apéndice 5*

**Técnicas de recuento de las lombrices juveniles nacidas de los capullos**

La selección manual de las lombrices presentes en el sustrato del suelo es muy lenta. Se recomiendan, por lo tanto, dos métodos alternativos:

a) Los recipientes de ensayo se colocan en un baño de agua, inicialmente a la temperatura de 40 °C pero que va aumentando hasta los 60 °C. Tras un período de 20 minutos aproximadamente, las lombrices juveniles deben aparecer en la superficie del suelo, de donde se pueden retirar fácilmente y contar.

b) El suelo de ensayo puede lavarse a través de un tamiz usando el método elaborado por van Gestel *et al.* (1), siempre que la turba y el estiércol o harina de avena añadidos al suelo estuvieran molidos hasta formar un polvo fino. Se ponen uno encima de otro dos tamices cuya luz de malla sea de 0,5 mm (diámetro 30 cm). El contenido de un recipiente de ensayo se lava a través de los tamices con una fuerte corriente de agua del grifo, dejando las lombrices jóvenes y los capullos principalmente en el tamiz superior. Es importante señalar que la totalidad de la superficie del tamiz superior debe mantenerse húmeda durante esta operación, de forma que las lombrices juveniles floten en una película de agua, lo que les impide deslizarse a través de los poros del tamiz. Los mejores resultados se obtienen utilizando una alcachofa de ducha.

Una vez que todo el sustrato del suelo se ha lavado a través del tamiz, los juveniles y los capullos se pasan a una cubeta arrastrándolos con agua desde el tamiz superior. El contenido de la cubeta se deja reposar para que los capullos vacíos floten en la superficie del agua y los capullos llenos y las lombrices juveniles vayan al fondo. El agua de la cubeta puede decantarse y las lombrices juveniles y los capullos se transfieren a una placa de Petri que contenga un poco de agua. Las lombrices pueden retirarse para su recuento con una aguja o unas pinzas.

La experiencia ha demostrado que el método a) es más adecuado para la extracción de lombrices juveniles, que podrían ser arrastradas, incluso a través de un tamiz de 0,5 mm.

Siempre debe determinarse la eficiencia del método utilizado para retirar las lombrices (y los capullos cuando proceda) del sustrato de suelo. En el caso de que los juveniles se recojan mediante la técnica de clasificación manual, es recomendable realizar la operación dos veces con todas las muestras.

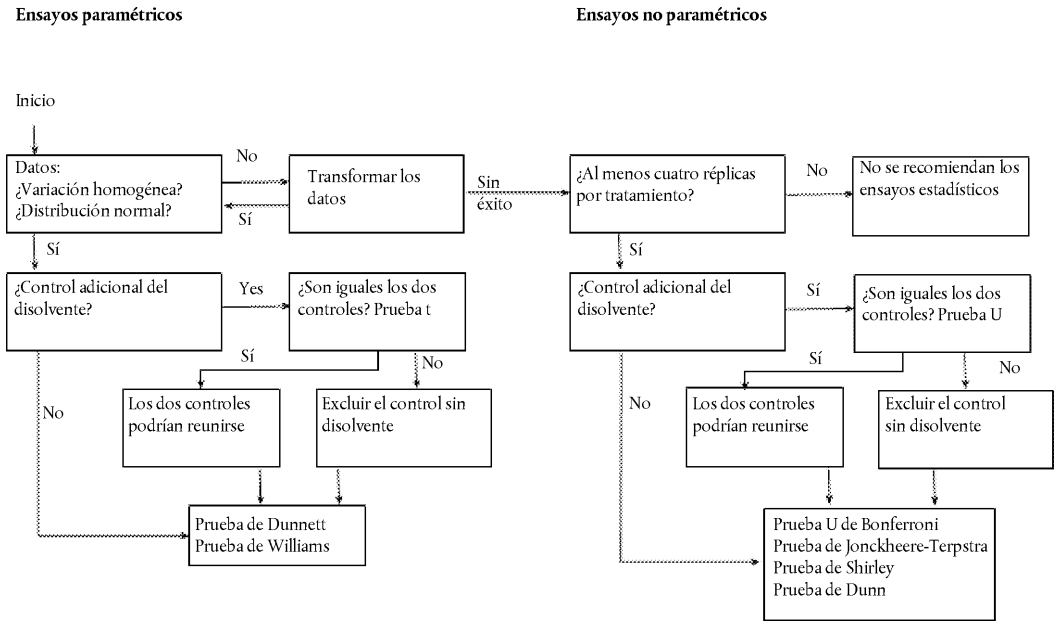
BIBLIOGRAFÍA:

(1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. Pedobiologia 32:367-371.

▼**M6**

*Apéndice 6*

**Resumen de la evaluación estadística de los datos (determinación de la NOEC)**



▼M6

## C.34. DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE BACTERIAS ANAEROBIAS. REDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GAS DE LODOS (DE DEPURADORA) EN CONDICIONES ANAERÓBICAS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 224 (2007). Las sustancias vertidas al medio acuático pasan por zonas tanto aeróbicas como anaeróbicas, en las que pueden degradarse y/o pueden inhibir la actividad bacteriana; en algunos casos pueden permanecer en las zonas anaeróbicas sin alterarse durante décadas o más aún. En el tratamiento de las aguas residuales, la primera fase, de sedimentación primaria, es aeróbica en el líquido sobrenadante y anaeróbica en el lodo subyacente. Posteriormente, en la segunda fase, hay una zona aeróbica en el tanque de aireación del lodo activado y una zona anaeróbica en el lodo subyacente en el tanque de sedimentación secundaria. El lodo de estas dos fases se somete normalmente a tratamiento anaeróbico, con producción de metano y dióxido de carbono que se utilizan normalmente para la producción de electricidad. En el medio ambiente en general, es probable que las sustancias que alcanzan los sedimentos de las bahías, los estuarios y el mar permanezcan en estas zonas anaeróbicas de forma indefinida si no son biodegradables. Algunas sustancias llegan en grandes proporciones preferentemente a estas zonas debido a sus propiedades físicas, tales como su baja hidrosolubilidad o su alta adsorción a los sólidos en suspensión, así como a que no pueden biodegradarse en condiciones aeróbicas.

2. Si bien es deseable que las sustancias vertidas al medio ambiente sean biodegradables en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas, es esencial que tales sustancias no inhiban la actividad de los microorganismos de ninguna de las zonas. En el Reino Unido ha habido algunos casos de inhibición completa de la producción de metano debidos, por ejemplo, a la presencia de pentaclorofenol en los vertidos industriales, lo que ha implicado el transporte, muy costoso, de los lodos inhibidos desde los digestores hasta sitios «seguros», y la importación de lodos de digestión no contaminados procedentes de instalaciones próximas. Pero ha habido muchos casos de alteración menos grave de la digestión por algunas otras sustancias, incluidos los hidrocarburos alifáticos halogenados (limpieza en seco) y los detergentes, con reducción significativa de la eficiencia de la digestión.

3. Solo un método de ensayo, el C.11 (1), se refiere a la inhibición de la actividad bacteriana (respiración del lodo activado) y evalúa el efecto de las sustancias problema sobre la tasa de consumo de oxígeno en presencia de sustrato. El método ha sido ampliamente utilizado para la detección temprana de posibles efectos nocivos de las sustancias sobre el tratamiento aeróbico de las aguas residuales, así como para indicar las concentraciones no inhibitorias de las sustancias problema utilizadas en los diferentes ensayos de biodegradabilidad. El método de ensayo C.43 (2) ofrece una oportunidad limitada para determinar la toxicidad de una sustancia problema en cuanto a la producción de gas por lodos anaeróbicos, diluidos a una décima parte de su concentración normal de sólidos para que se pueda alcanzar la precisión requerida en la evaluación del porcentaje de biodegradación. Como el lodo diluido podría ser más sensible a las sustancias inhibidoras, el grupo de la ISO decidió preparar un método que utilizara lodo sin diluir. Se estudiaron al menos tres textos (de Dinamarca, Alemania y el Reino Unido) y, por último, se prepararon dos normas ISO, una con lodos sin diluir, la ISO 13641-1 (3) y otra con dilución a una centésima, la ISO 13641-2 (4), para representar fangos y sedimentos con bajas poblaciones de bacterias. Ambos métodos han sido sometidos a un ensayo interlaboratorios (5); la parte 1 se confirmó como norma aceptable, pero no hubo consenso acerca de la parte 2. El Reino Unido consideraba que el método requiere más investigación, ya que una proporción significativa de los participantes informaron de una producción de gas muy escasa o nula, en parte debido a que el porcentaje del espacio para el gas era demasiado elevado (del 75 %) para una sensibilidad óptima.

4. En trabajos anteriores realizados en el Reino Unido (6) (7) se describe un método manométrico que utiliza lodo de digestión sin diluir, más lodos de depuradora sin tratar como sustrato, en frascos de 500 ml; el equipo era pesado y resultaba nauseabundo el mal olor de los lodos sin tratar. Más tarde, Wilson *et al.* (10) aplicaron con éxito el equipo más compacto y

▼M6

cómodo de Shelton y Tiedje (8), desarrollado por Battersby y Wilson (9). Kawahara *et al.* (11) prepararon con éxito lodos más homogéneos en el laboratorio para su uso en pruebas de biodegradabilidad anaeróbica y de inhibición en relación con una serie de sustancias. Asimismo, el lodo sin tratar se sustituyó como sustrato para llevar a cabo un ensayo con lodo anaeróbico diluido a una centésima o con fangos, sedimentos, etc., de baja actividad bacteriana.

5. Este método puede proporcionar información útil para predecir el efecto probable de una sustancia problema sobre la producción de gas en digestores anaeróbicos. Sin embargo, solamente mediante ensayos más largos que simulen de forma más próxima el funcionamiento de los digestores de trabajo cabe indicar si puede producirse la adaptación de los microorganismos a la sustancia problema o si es posible que las sustancias que puedan absorberse y adsorberse en los lodos lleguen a generar una concentración tóxica en un plazo más largo de lo que permite este ensayo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. Unas alícuotas de una mezcla de lodos de digestión anaeróbica (con entre 20 g/l y 40 g/l de sólidos totales) y una solución de sustrato degradable se incuban solas y simultáneamente con una gama de concentraciones de la sustancia problema en recipientes sellados durante un plazo de hasta 3 días. La cantidad de gas producido (metano y dióxido de carbono) se mide por el aumento de presión (Pa) en los frascos. El porcentaje de inhibición de la producción de gas que se debe a las distintas concentraciones de la sustancia problema se calcula a partir de las cantidades producidas en los respectivos frascos de ensayo y de control. Las concentraciones ($EC_{50}$ y con otro efecto) se calculan a partir de las gráficas del porcentaje de inhibición frente a la concentración de las sustancias problema o, más generalmente, su logaritmo.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

7. Las sustancias problema deben utilizarse normalmente en la forma más pura fácilmente disponible, dado que las impurezas de ciertas sustancias, por ejemplo de los clorofenoles, pueden ser mucho más tóxicas que la sustancia problema en sí. No obstante, debe considerarse la necesidad de someter a ensayo las sustancias problema en la forma en que se producen o se comercializan. El uso de productos formulados no se recomienda en principio, pero puede ser adecuado en el caso de sustancias problema poco solubles. Entre las propiedades de la sustancia problema que deben conocerse se cuentan la solubilidad en agua y en algunos disolventes orgánicos, la presión de vapor, el coeficiente de adsorción, la hidrólisis y la biodegradabilidad en condiciones anaeróbicas.

APLICABILIDAD DEL MÉTODO

8. El ensayo es aplicable a las sustancias tanto solubles como insolubles en agua, incluidas las sustancias volátiles. No obstante, ha de prestarse una atención especial a los materiales de baja hidrosolubilidad [véase la referencia (12)] y de alta volatilidad. Asimismo, pueden utilizarse inóculos procedentes de otras zonas anaeróbicas como, por ejemplo, fangos, suelos saturados o sedimentos. Los sistemas bacterianos anaerobios que se han expuesto previamente a sustancias tóxicas pueden adaptarse para mantener su actividad en presencia de sustancias xenobióticas. Los inóculos de sistemas bacterianos adaptados pueden mostrar mayor tolerancia a las sustancias problema en comparación con los inóculos procedentes de sistemas no adaptados.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Para comprobar el procedimiento se somete a ensayo una sustancia de referencia, preparando unos recipientes adecuados en paralelo como parte del proceso normal de ensayo; se ha comprobado que el 3,5-diclorofenol es un inhibidor estable de la producción anaeróbica de gas, así como del consumo de oxígeno por los lodos activados y de otras reacciones bioquímicas. Se ha demostrado que otras dos sustancias son más inhibidoras de la producción de metano que el 3,5-diclorofenol, a saber, el bis-tiocianato de metileno y el pentaclorofenol, pero los resultados con estas sustancias no se han validado. No se recomienda el pentaclorofenol por no estar fácilmente disponible en forma pura.

▼M6

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS

10. En un ensayo interlaboratorios internacional (5) solo se encontró una reproducibilidad moderada en los valores de la $EC_{50}$ entre los diez laboratorios participantes en cuanto al 3,5-diclorofenol y al ácido 2-bromo-etanosulfónico (el intervalo para la primera sustancia fue de 32 - 502 mg/l y para la segunda de 220 - 2 190 mg/l).

| Número de laboratorios | En mg/l | | | En mg/g de lodo | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Media | Desviación típica | CV (%) | Media | Desviación típica | CV (%) |
| | 3,5-Diclorofenol | | | | | |
| 10 | 153 | 158 | 103 | 5 | 4,6 | 92 |
| | Ácido 2-bromo-etanosulfónico | | | | | |
| 10 | 1 058 | 896 | 85 | 34 | 26 | 76 |

Datos de $EC_{50}$ del ensayo interlaboratorios — lodo sin diluir

11. Los elevados coeficientes de variación entre laboratorios reflejan en gran medida las diferencias en cuanto a la sensibilidad de los microorganismos de los lodos debidas a una eventual exposición previa o a la ausencia de exposición previa a la sustancia problema o a sustancias químicamente relacionadas con ella. La precisión con la que se determinó el valor de $EC_{50}$ sobre la base de la concentración en el lodo era apenas mejor que la correspondiente al valor «volumétrico» (mg/l). Los tres laboratorios que comunicaron la precisión de sus valores de $EC_{50}$ para el 3,5-diclorofenol indicaron unos coeficientes de variación mucho menores (22, 9 y 18 %, respectivamente para la $EC_{50}$ en mg/g) que los de las medias del conjunto de los diez laboratorios. Las medias individuales de los tres laboratorios fueron de 3,1, 3,2 y 2,8 mg/g, respectivamente. Los valores menores y aceptables de los coeficientes de variación dentro de los laboratorios, frente a los valores mucho más elevados entre laboratorios, a saber, del 9 al 22 % frente al 92 %, indican que existen importantes diferencias en las propiedades de los distintos lodos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

12. Se utilizará material habitual de laboratorio, además de lo siguiente:

a) Incubador, antichispas y con temperatura controlada a 35 °C ± 2 °C;

b) Recipientes de ensayo de vidrio resistentes a la presión de un tamaño nominal adecuado ([1]), cada uno provisto de un tapón con revestimiento estanco a los gases, capaz de resistir unos 2 bar o $2 \times 10^5$ Pa (para el revestimiento puede utilizarse, p. ej., PTFE = politetrafluoroetileno). Se recomienda utilizar frascos de suero de vidrio de 125 ml de volumen nominal, con un volumen real de unos 160 ml, cerrados con tapones de suero ([2]) y cápsulas de aluminio, pero también pueden utilizarse sin problemas frascos de volumen total entre 0,1 y 1 litro;

([1]) El tamaño recomendado es de 0,1 a 1 litro.

([2]) Se recomienda usar tapones de silicona estancos a los gases. Se recomienda también comprobar la estanqueidad de los cierres, especialmente de los tapones de caucho butílico, porque diversos tapones disponibles en el comercio no son suficientemente estancos al gas metano y algunos tapones no mantienen la estanqueidad cuando se perforan con una aguja en las condiciones del ensayo.
- Se recomienda el uso de tapones con revestimiento estanco a los gases y este uso es obligatorio en caso de sustancias volátiles (algunos tapones comerciales son relativamente finos, de menos de 0,5 cm, y no permanecen estancos a los gases después de perforarse con una aguja de jeringa).
- Son recomendables los tapones de caucho butílico (de alrededor de 1 cm), si las sustancias problema no son volátiles (estos se mantienen normalmente estancos a los gases después de perforarse).
- Antes del ensayo, se recomienda examinar cuidadosamente los tapones teniendo en cuenta su capacidad para mantenerse estancos a los gases tras su perforación.

▼M6

c) Manómetro de precisión [1] y agujas fijadas

La producción total de gas (metano y dióxido de carbono) se mide por medio de un manómetro adaptado para permitir la medición y la evacuación del gas producido. Un ejemplo de instrumento apropiado es un manómetro de precisión portátil conectado a una aguja de jeringa; una llave de tres vías estanca para los gases facilita la liberación del exceso de presión (apéndice 1). Es necesario mantener lo más bajo posible el volumen interno de la llave y de los tubos del transductor de presión, con el fin de que los errores introducidos por despreciar el volumen del equipo sean insignificantes;

d) Recipientes aislados, para el transporte de los lodos de digestión;

e) Llaves de presión de tres vías;

f) Tamiz, con malla de 1 $mm^2$;

g) Depósito, para los lodos de digestión, frasco de polietileno de alta densidad o de vidrio, de 5 litros de capacidad, provisto de un agitador y de dispositivos para el paso de una corriente de gas nitrógeno (véase el punto 13) a través del espacio libre;

h) Filtros de membrana (0,2 μm) para esterilizar el sustrato;

i) Microjeringas, para la conexión, estanca a los gases, del transductor de presión [véase el punto 12, letra c)] al espacio libre de las botellas [véase el punto 12, letra b)]; también para añadir a los frascos los eventuales materiales de ensayo líquidos insolubles;

j) Caja de guantes, opcional pero recomendada, con una ligera presión positiva de nitrógeno.

**Reactivos**

13. Deben utilizarse siempre reactivos de pureza analítica. Debe utilizarse en todo el ensayo gas nitrógeno de pureza elevada, con un contenido en oxígeno inferior a 5μl/l.

**Agua**

14. En caso de que sea necesario realizar una dilución en cualquier fase, utilícese agua desionizada desgasificada anteriormente. No es necesario controlar analíticamente esta agua, pero hay que velar por el mantenimiento periódico del equipo de desionización. También debe usarse agua desionizada para la preparación de las soluciones madre. Antes de la adición del inóculo anaerobio a cualquier solución o dilución de material problema, hay que asegurarse de que estas están exentas de oxígeno. Se hace pasando gas nitrógeno a través del agua de dilución (o a través de las diluciones) durante 1 hora antes de añadir el inóculo, o bien calentando el agua de dilución hasta el punto de ebullición y enfriándola a continuación a temperatura ambiente en una atmósfera exenta de oxígeno.

**Lodo digerido**

15. Recoger lodos de digestión activos de un digestor de una depuradora de aguas residuales o, alternativamente, de un digestor de laboratorio, que trate lodos procedentes sobre todo de aguas residuales domésticas. Puede encontrarse en otras referencias (11) información práctica en relación con los lodos de digestores de laboratorio. Si está previsto utilizar un inóculo adaptado puede considerarse la posibilidad de recurrir a lodos de digestión procedentes de una depuradora de aguas residuales industriales. Para recoger los lodos han de utilizarse frascos de boca ancha, hechos de polietileno de

[1] El manómetro debe utilizarse y calibrarse periódicamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si un manómetro de la calidad prescrita se utiliza, por ejemplo, encapsulado con una membrana de acero, no es necesario proceder a su calibración en el laboratorio. Debe ser calibrado por un centro autorizado a los intervalos recomendados. La exactitud de la calibración puede comprobarse en el laboratorio con una medición en un punto único a $1 \times 10^5$ Pa frente a un manómetro con indicador mecánico. Si este punto se mide correctamente, la linealidad tampoco habrá cambiado. Si se utilizan otros dispositivos de medición (sin calibración certificada por el fabricante), se recomienda la conversión a lo largo de todo el intervalo a distancias regulares (apéndice 2).

▼M6

alta densidad o de material similar que pueda expandirse. Hay que añadir lodo a los frascos de muestreo hasta que el nivel quede a alrededor de 1 cm del extremo superior de los frascos, cerrarlos herméticamente, de preferencia con una llave de seguridad [punto 12, letra e)], y ponerlos en recipientes aislados [punto 12, letra d)] para reducir el contraste de temperatura, hasta que se transfieran a un incubador mantenido a 35 °C ± 2 °C. Al abrir los frascos ha de tenerse precaución para liberar el exceso de presión de los gases aflojando cuidadosamente el cierre, o mediante una llave de liberación de presión de tres vías [punto 12, letra e)]. Es preferible utilizar el lodo en el plazo de unas horas desde su recogida; si no es así, puede conservarse a 35 °C ± 2 °C con el espacio libre lleno de nitrógeno, hasta un máximo de tres días, plazo en el que normalmente se pierde poca actividad.

Advertencia: Los lodos de digestión producen gases inflamables que presentan riesgo de incendio y de explosión; también contienen organismos potencialmente patógenos, por lo que es necesario tomar las precauciones adecuadas para manipular los lodos. Por motivos de seguridad, no deben utilizarse recipientes de vidrio para la recogida de lodos.

**Inóculo**

16. Inmediatamente antes de utilizarlo, mezclar el lodo mediante agitación suave y pasarlo a través de un tamiz de 1 $mm^2$ de malla [punto 12, letra f)] a un frasco adecuado [punto 12, letra g)] a través de cuyo espacio libre se hace pasar una corriente de nitrógeno. Se reserva una muestra para la medición de la concentración de sólidos secos totales [véase, por ejemplo, la norma ISO 11923 (13) o alguna norma equivalente de la UE]. En general, los lodos se utilizan sin dilución. La concentración de sólidos está generalmente entre el 2 y el 4 % (p/v). Compruébese el valor de pH del lodo y, si es necesario, ajústese a 7 ± 0,5.

**Sustrato de ensayo**

17. Se disuelven 10 g de caldo nutritivo (p. ej., Oxoid), 10 g de extracto de levadura y 10 g de D-glucosa en agua desionizada, y se diluye hasta 100 ml. Se esteriliza por filtración a través de un filtro de membrana de 0,2 μm [punto 12, letra h)] y se utiliza inmediatamente o se conserva a 4 °C durante un plazo máximo de un día.

**Sustancia problema**

18. Se prepara una solución madre distinta para cada sustancia problema hidrosoluble, que contenga, por ejemplo, 10 g/l de la sustancia en agua de dilución exenta de oxígeno (punto 14). Los volúmenes de estas soluciones madre deben ser adecuados para preparar las mezclas de reacción con concentraciones graduadas. Otra posibilidad consiste en preparar una serie de diluciones de cada solución madre de forma que el volumen añadido a los frascos de ensayo sea el mismo para cada concentración final necesaria. Hay que ajustar el pH de las soluciones madre a 7 ± 0,2, si es necesario;

19. Para las sustancias problema insuficientemente hidrosolubles, consúltese la norma ISO 10634 (12) o alguna norma equivalente de la UE. Si se necesita utilizar un disolvente orgánico, evítense los disolventes tales como el cloroformo y el tetracloruro de carbono, de los que se sabe que inhiben fuertemente la producción de metano. Se prepara una disolución de la sustancia insoluble en agua a una concentración adecuada en un disolvente volátil adecuado como, por ejemplo, acetona o éter dietílico. Se añaden a frascos de ensayo vacíos [punto 12, letra b)] los volúmenes requeridos de la disolución en disolvente y se evapora el disolvente antes de añadir los lodos. Para otros tratamientos, utilícese la norma ISO 10634 (12) o norma equivalente de la UE, teniendo en cuenta que los eventuales tensioactivos que se utilicen para producir emulsiones pueden resultar inhibidores para la producción anaerobica de gas. Si se considera que la presencia de disolventes orgánicos y emulsificantes produce artefactos, la sustancia problema puede añadirse directamente a la mezcla de ensayo en forma de polvo o líquido. Las sustancias volátiles y las sustancias líquidas insolubles en agua pueden inyectarse en frascos de suero inoculado, utilizando microjeringas [punto 12, letra i)].

▼M6

20. Se añade la sustancia problema a los frascos para obtener una serie geométrica de concentraciones como, por ejemplo, 500 mg/l, 250 mg/l, 125 mg/l, 62,5 mg/l, 31,2 mg/l and 15,6 mg/l. Si no se conoce el intervalo de toxicidad de sustancias similares, debe efectuarse en primer lugar un ensayo preliminar de determinación del intervalo, con las concentraciones de 1 000 mg/l, 100 mg/l y 10 mg/l para establecer el intervalo adecuado.

**Sustancia de referencia**

21. Se prepara una solución acuosa de 3,5-diclorofenol (10 g/l) añadiendo gradualmente al sólido la cantidad mínima de solución de hidróxido de sodio 5 mol/l, agitando a la vez, hasta que se haya disuelto. Añadir a continuación agua de dilución desoxigenada (punto 14) hasta el volumen necesario; puede facilitarse la disolución con un baño de ultrasonidos. Pueden utilizarse otras sustancias de referencia cuando se ha obtenido el intervalo medio de la $EC_{50}$ en al menos tres ensayos con diferentes inóculos (diferentes fuentes o diferentes momentos de recogida).

INTERFERENCIAS/ERRORES

22. Resulta probable que algunos componentes de los lodos puedan reaccionar con inhibidores potenciales de manera que estos queden indisponibles para los microorganismos, con lo que se reduciría o incluso se anularía la inhibición. Además, en el supuesto de que los lodos ya contengan una sustancia inhibidora, se obtendrían resultados erróneos cuando dicha sustancia fuera objeto de ensayo. Aparte de estas posibilidades, se ha identificado una serie de factores que pueden dar lugar a resultados falsos. Se recogen en el apéndice 3, junto con métodos para eliminar o, al menos, reducir los errores.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

23. El número de réplicas necesarias depende del grado de precisión necesario para los índices de inhibición. Si los cierres de los frascos son suficientemente estancos a los gases durante el tiempo del ensayo, se debe utilizar un solo lote (al menos con tres réplicas) de frascos de ensayo a cada concentración exigida. Del mismo modo, se utiliza un solo lote de frascos con la sustancia de referencia y un solo conjunto de controles. No obstante, en el caso de que los cierres de los frascos sean fiables para únicamente una o unas pocas perforaciones, se debe utilizar un lote (por ejemplo, por triplicado) de frascos de ensayo para cada intervalo (t) en el que sea necesario disponer de resultados para todas las concentraciones de la sustancia problema que se hayan de someter a ensayo. Del mismo modo, se deben utilizar «t» lotes de frascos para la sustancia de referencia y para los controles.

24. Se recomienda utilizar una caja de guantes [punto 12, letra j)]. Al menos 30 minutos antes de comenzar el ensayo, se pone en marcha un flujo de gas nitrógeno a través de una caja de guantes con todo el equipo necesario. Hay que velar por que la temperatura del lodo esté en el intervalo de 35 °C ± 2 °C durante la manipulación y el cerrado de los frascos.

**Ensayo preliminar**

25. En caso de que se desconozca la actividad del lodo, se recomienda proceder a un ensayo preliminar. Se deben establecer controles para obtener unas concentraciones de sólidos de, por ejemplo, 10 g/l, 20 g/l y 40 g/l más el sustrato, pero sin sustancia problema. Asimismo, se deben utilizar distintos volúmenes de la mezcla de reacción para disponer de tres o cuatro proporciones de volumen del espacio libre y volumen del líquido. A partir de los resultados de los volúmenes de gas producidos a distintos intervalos de tiempo, se eligen las condiciones más adecuadas que permitan la obtención de dos mediciones diarias que indiquen volúmenes significativos de gases y liberación de presión al día con sensibilidad óptima ([1]) sin temor a las explosiones.

**Adición de las sustancias problema**

26. Las sustancias problema hidrosolubles se añaden a los frascos de ensayo vacíos [punto 12, letra b)] como soluciones acuosas (punto 18). Se utilizan conjuntos de frascos al menos por triplicado para cada concentración de una

([1]) Esto se aplica al diseño experimental y a las condiciones experimentales en que los volúmenes de gas producidos (en los blancos de control y en los recipientes que indiquen inhibición del 70 al 80 %) pueden calcularse con márgenes de error aceptables.

▼M6

serie de concentraciones (punto 20). En el caso de las sustancias problema poco solubles e insolubles, se inyectan soluciones de estas en disolventes orgánicos con una microjeringa en los frascos vacíos para obtener conjuntos de réplicas para cada concentración de una serie de cinco concentraciones de sustancia problema. Se evapora el disolvente mediante un chorro de gas nitrógeno sobre la superficie de las soluciones contenidas en los frascos de ensayo. Otra posibilidad consiste en añadir las sustancias sólidas insolubles pesándolas directamente en los frascos de ensayo.

27. Si las sustancias líquidas insolubles y poco solubles en agua no se añaden utilizando un disolvente, se añaden directamente mediante una microjeringa a los frascos de ensayo tras la adición del inóculo y del sustrato de ensayo (véase el punto 30). Las sustancias problema volátiles pueden añadirse de la misma manera.

**Adición de inóculo y sustrato**

28. Se agita un volumen adecuado del lodo de digestión tamizado (véase el punto 16) en un frasco de 5 litros [punto 12, letra g)], mientras se pasa una corriente de gas nitrógeno a través del espacio libre. Los frascos de ensayo que contienen soluciones acuosas o soluciones en disolventes evaporados de las sustancias problema se purgan con una corriente de gas nitrógeno durante unos dos minutos para extraer el aire. Se dispensan en los frascos de ensayo alícuotas de, por ejemplo, 100 ml del lodo bien mezclado, utilizando una pipeta de boca ancha o una probeta. Es esencial llenar la pipeta de una sola vez hasta el volumen exacto de lodo exigido, dada la facilidad de sedimentación de los sólidos del lodo. Si se toma una cantidad excesiva, se ha de vaciar la pipeta y volver a empezar.

29. A continuación se añade suficiente cantidad de solución de sustrato (punto 17) para conseguir una concentración en la mezcla de 2 g/l de cada uno de los siguientes componentes: caldo nutritivo, extracto de levadura y D-glucosa, mientras que se sigue pasando nitrógeno. A continuación se muestra un ejemplo de lotes de ensayo.

| Concentración final en masa de la sustancia problema en los frascos de ensayo (mg/l) | Volumen de la sustancia problema (ml) | | Reactivos y medios (ml) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Solución madre a) 10 g/l punto 18 | Solución madre b) 1 g/l punto 18 | Agua de dilución punto 14 | Inóculo punto 16 | Sustrato punto 17 |
| 0 | — | 0 | 1,0 | 100 | 2 |
| 1 | — | 0,1 | 0,9 | 100 | 2 |
| 3,3 | — | 0,33 | 0,67 | 100 | 2 |
| 10 | 0,1 | — | 0,9 | 100 | 2 |
| 33 | 0,33 | — | 0,67 | 100 | 2 |
| 100 | 1,0 | — | 0 | 100 | 2 |

Volumen total del frasco = 160 ml. Volumen de líquido = 103 ml.
Volumen de gas = 57 ml, o el 35,6 % del volumen total.

30. Del mismo modo se purga con gas nitrógeno un número suficiente de frascos de ensayo vacíos para ensayar las eventuales sustancias problema volátiles o líquidas insolubles (véase el punto 27).

▼M6

**Controles y sustancia de referencia**

31. Se preparan conjuntos al menos triplicados de frascos con lodo y sustrato solamente, para actuar de controles. Se preparan frascos replicados adicionales con lodo y sustrato más una cantidad suficiente de solución madre de la sustancia de referencia, 3,5-diclorofenol (punto 21), para obtener una concentración final de 150 mg/l. Esta concentración debe inhibir la producción de gas en alrededor del 50 %. Otra posibilidad es preparar un intervalo de concentraciones de la sustancia de referencia. Además, se preparan cuatro frascos adicionales para la medición del pH, con lodo, agua desoxigenada y sustrato. Se añade la sustancia problema a dos frascos a la concentración más alta ensayada y se añade agua desoxigenada a los otros dos frascos.

32. Ha de velarse por que todos los frascos (sustancias problema y de referencia, y controles) contengan el mismo volumen de líquido ($V_R$); en caso necesario, se añade agua desionizada desoxigenada (punto 14) para completar el volumen. El espacio libre debe constituir entre el 10 % y el 40 % del volumen de los frascos, seleccionándose el valor real a partir de los datos obtenidos en el ensayo preliminar. Después de añadir a los frascos todos los componentes, se retira la aguja que suministra el gas y se cierra cada frasco con tapón de caucho y cápsula de aluminio [punto 12, letra b)], humedeciendo el tapón con una gota de agua desionizada para ayudar a su inserción. Se mezcla el contenido de cada frasco por agitación.

**Incubación de los frascos**

33. Se transfieren los frascos al incubador de temperatura controlada, provisto preferentemente de un dispositivo de agitación, y se mantienen a 35 °C ± 2 °C. Los frascos se incuban en la oscuridad. Después de aproximadamente 1 hora, se iguala la presión de los frascos a la atmosférica mediante la inserción de una aguja de jeringa, unida al manómetro [punto 12, letra c)], a través del cierre de cada frasco, uno tras otro; se abre la llave hasta que el manómetro indique presión cero y, por último, se cierra la llave. La aguja debe insertarse a un ángulo de unos 45° para evitar la fuga de gas de los frascos. Si los frascos se incuban sin mecanismo de agitación, hay que agitarlos manualmente dos veces al día durante todo el período de incubación para equilibrar el sistema. Los frascos se incuban en posición invertida para evitar cualquier pérdida de gas a través del tapón. Sin embargo, la inversión no es apropiada en los casos en que quepa la posibilidad de que las sustancias problema insolubles se adhieran al fondo del frasco.

**Medida de la presión**

34. Cuando los frascos hayan alcanzado la temperatura de 35 °C ± 2 °C, se mide y registra el pH del contenido de dos de los cuatro frascos preparados al efecto y se desecha este contenido; los frascos restantes siguen incubándose en la oscuridad. Se mide y se registra la presión de los frascos dos veces al día durante el siguiente período de 48 a 72 horas, mediante la inserción de la aguja del manómetro a través del cierre de cada frasco, uno tras otro, secando la aguja después de cada medida. Todas las partes del frasco deben mantenerse a la temperatura de incubación durante la medición, que debe llevarse a cabo lo más deprisa posible. Se registra la lectura de la presión una vez se haya estabilizado. A continuación se abre la llave para ventilar, y se cierra cuando la presión llegue a cero. Se prosigue el ensayo por lo general durante un período de 48 horas desde el momento de la primera igualación de la presión, designado «tiempo 0». El número de lecturas y de ventilaciones debe limitarse en el caso de las sustancias volátiles a uno (al final de la incubación) o dos para reducir al mínimo las pérdidas de sustancia problema (10).

35. Si la lectura de la presión es negativa, no se debe abrir la llave. A veces se acumula la humedad en la aguja de jeringa y en los tubos, lo que se pone de manifiesto por la lectura de una pequeña presión negativa. En tal caso, se extrae la aguja, se agitan los tubos, se secan con un paño y se pone una nueva aguja.

**Medición del pH**

36. Se mide y se registra el pH del contenido de cada frasco, después de la última medida de la presión.

▼M6

DATOS E INFORME

**Expresión de los resultados**

37. Se calculan la suma y la media de las presiones registradas en cada intervalo de tiempo para cada serie de frascos replicados y se calcula la media de la presión de gas global acumulada en cada intervalo de tiempo para cada serie de réplicas. Se trazan las curvas de la media de la producción de gas acumulada (Pa) frente al tiempo, correspondientes a los frascos de control, de ensayo y de referencia. Se selecciona un tiempo de la parte lineal de la curva, normalmente 48 horas, y se calcula el porcentaje de inhibición (I) para cada concentración a partir de la ecuación [1]:

$$I = (1 - P_t/P_C) \times 100 \quad [1],$$

donde

$I$ = porcentaje de inhibición, en %;

$P_t$ = presión del gas producido con el material de ensayo al tiempo seleccionado, en pascales (Pa);

$P_c$ = presión del gas producido en el control al mismo tiempo, en pascales (Pa).

Es aconsejable trazar ambas gráficas, es decir, la gráfica de I frente a la concentración y también frente al logaritmo de la concentración, de manera que se pueda seleccionar la curva que se aproxime más a la linealidad. Se determina el valor de la $EC_{50}$ (mg/l) visualmente o por análisis de regresión a partir de esa curva más próxima a la linealidad. A efectos de comparación, puede resultar más útil expresar la concentración de la sustancia en mg/g de sólidos secos totales. Para obtener esta concentración, se divide la concentración volumétrica (mg/l) por la concentración volumétrica de sólidos del lodo seco (g/l) (punto 16).

38. Se calcula el porcentaje de inhibición obtenido por la concentración única de la sustancia de referencia utilizada o la $EC_{50}$ si se ha estudiado un número suficiente de concentraciones.

39. El valor medio de la presión del gas producido en el control $P_c$ (Pa) se convierte en volumen recurriendo a la curva de calibración del manómetro (apéndice 2) y a partir de ese valor se calcula el rendimiento de gas, expresado como volumen producido en 48 horas por 100 ml de lodo sin diluir, a una concentración de sólidos de entre el 2 % (20 g/l) y el 4 % (40 g/l).

**Criterios de validez**

40. Los resultados del ensayo interlaboratorios de la ISO (5) ha puesto de manifiesto que la sustancia de referencia (3,5-diclorofenol) causaba una inhibición del 50 % de la producción de gas en un intervalo de concentraciones de 32 mg/l a 510 mg/l, con una media de 153 mg/l (punto 10). Este intervalo es tan amplio que no resulta posible establecer como criterios de validez unos límites precisos de la inhibición; para que sea posible, será necesario que se consiga saber cómo producir inóculos menos variables. El volumen de gas producido en los frascos de control en 48 horas varía entre 21 ml/g de materia seca de lodo y 149 ml/g (media de 72 ml/g). No había ninguna relación evidente entre el volumen de gas producido y el correspondiente valor de $EC_{50}$. El pH final variaba entre 6,1 y 7,5.

41. El ensayo se considera válido cuando se obtiene una inhibición de más del 20 % en el control de referencia que contiene 150 mg/l de 3,5-diclorofenol, se producen más de 50 ml de gas por gramo de materia seca en el control en blanco y el valor del pH está comprendido entre 6,2 y 7,5 al final de la prueba.

**Informe del ensayo**

42. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema*

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural y propiedades fisicoquímicas pertinentes;

▼M6

— pureza (impurezas) de la sustancia problema.

*Condiciones del ensayo*

— volumen del contenido líquido y del espacio libre en los recipientes de ensayo;

— descripción de los recipientes de ensayo y medición del gas (por ejemplo, tipo de manómetro);

— aplicación de la sustancia problema y de la sustancia de referencia al sistema de ensayo, concentraciones de ensayo utilizadas y empleo eventual de disolventes;

— datos del inóculo empleado: nombre de la depuradora de aguas residuales, descripción de la fuente de aguas residuales tratadas (por ejemplo, temperatura de funcionamiento, tiempo de retención del lodo, aguas residuales predominantemente domésticas o residuos industriales, etc.), concentración de sólidos, actividad de producción de gas del digestor anaeróbico, exposición previa o posible adaptación anterior a sustancias tóxicas o lugar de recogida de fangos, sedimentos, etc.;

— temperatura de la incubación e intervalo;

— número de réplicas.

*Resultados*

— valores de pH al final del ensayo;

— todos los datos medidos obtenidos con los recipientes de ensayo, de control en blanco y de sustancia de referencia, cuando proceda (por ejemplo, presión en Pa o milibares) en forma de cuadro;

— porcentaje de inhibición en los frascos de ensayo y de referencia, y curvas de inhibición-concentración;

— cálculo de los valores de $EC_{50}$, expresada en mg/l y en mg/g;

— producción de gas por g de lodo en 48 horas;

— motivos del eventual rechazo de resultados del ensayo;

— discusión de los resultados, incluidas la eventual desviación de los procedimientos de este método de ensayo y la eventual desviación de los resultados del ensayo respecto a lo que cabría esperar, debido a interferencias y errores;

— indicación de si el objetivo del ensayo es medir la toxicidad para microorganismos que hayan sufrido o no exposición previa.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Capítulo C.11 del presente anexo. Lodo activado: prueba de inhibición de la respiración.

(2) Capítulo C.43 del presente anexo. Biodegradabilidad anaeróbica de las sustancias orgánicas en lodo digerido: método de medición de la producción de gases.

(3) Organización Internacional de Normalización (2003) ISO 13641-1 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 1: General Test.

(4) Organización Internacional de Normalización (2003) ISO 13641-2 Water Quality — Determination of inhibition of gas production of anaerobic bacteria — Part 2: Test for low biomass concentrations.

(5) ISO (2000) Ring test of ISO 13641-1 and ISO 13641-2. Determination of inhibition of activity of anaerobic bacteria. BL 6958/A. Evans MR, Painter HA. Brixham Environmental Laboratory, AstraZeneca UK Ltd., Brixham, TQ5 8BA UK.

▼**M6**

(6) Swanwick JD, Foulkes M (1971). Inhibition of anaerobic digestion of sewage sludge by chlorinated hydrocarbons. Wat. Pollut. Control, 70, 58-70.

(7) HMSO (1986) Determination of the inhibitory effects of chemicals and waste waters on the anaerobic digestion of sewage sludge. ISBN 0 117519 43 X, En: Methods for the Examination of Waters and Associated Materials UK.

(8) Shelton DR, Tiedje JM (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Env. Microbiol. 47 850-857.

(9) Battersby NS and Wilson V (1988). Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic compounds under methanogenic conditions. Chemosphere 17, 2441-2460.

(10) Wilson V, Painter HA and Battersby NS (1992). A screening method for assessing the inhibition of the anaerobic gas production from sewage sludge. Proc. Int. Symp. on Ecotoxicology. Ecotoxicological Relevance of Test Methods, GSF Forschungzentrum, Neuherberg, Alemania (1990). Eds. Steinberg C y Kettrup A, pp. 117-132 (1992).

(11) Kawahara K, Yakabe Y, Chida T, and Kida K (1999). Evaluation of laboratory-made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. Chemosphere, 39 (12), 2007-2018.

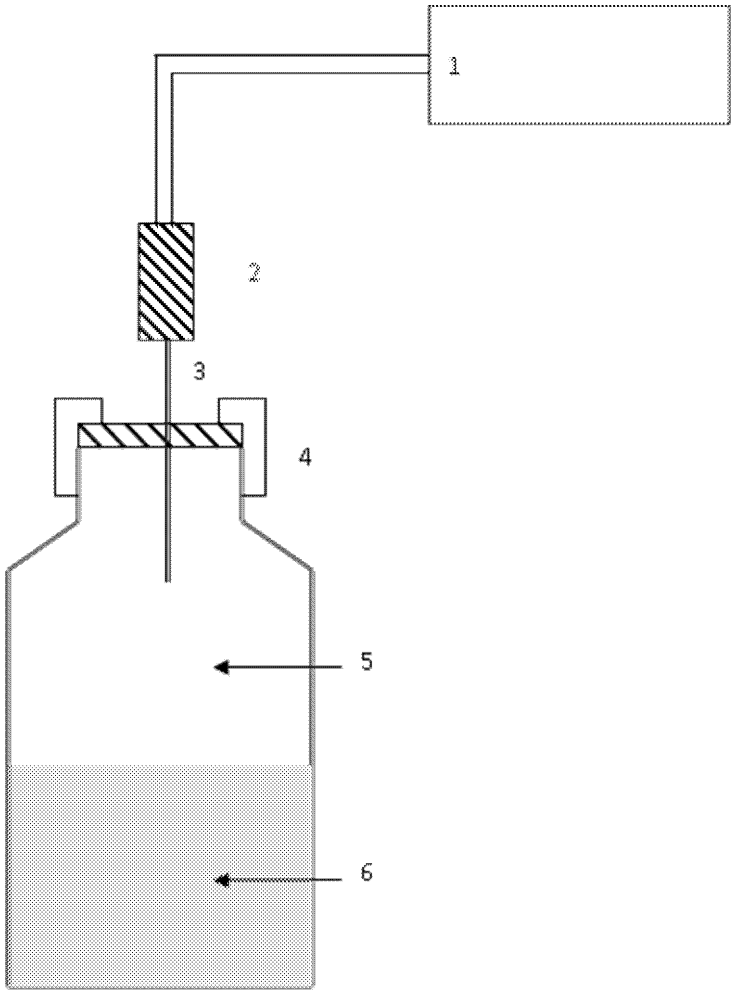
(12) Organización Internacional de Normalización (1995) ISO 10634. Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.

(13) Organización Internacional de Normalización, ISO 11923 (1997) Calidad del agua. Determinación de los sólidos en suspensión. Método de filtración por filtro de fibra de vidrio..

▼**M6**

*Apéndice 1*

**Ejemplo de aparato para medir la producción de biogás mediante la presión del gas**




*Leyenda:*

1 — Manómetro

2 — Llave de tres vías estanca al gas

3 — Aguja de jeringa

4 — Cierre estanco a los gases (cápsula y tapón)

5 — Espacio libre

6 — Inóculo de lodo digerido

Recipiente de ensayo mantenido en un ambiente a 35 °C ± 2 °C

▼M6

*Apéndice 2*

**Conversión DE las lecturas del manómetro**

Las lecturas del manómetro pueden relacionarse con los volúmenes de gas por medio de una curva patrón y a partir de esta se puede calcular el volumen de gas producido por g de lodo seco en 48 horas. Este índice de actividad se utiliza como uno de los criterios con los que se evalúa la validez de los resultados del ensayo. La curva de calibración se obtiene inyectando volúmenes conocidos de gas a 35 °C ± 2 °C en frascos de suero que contienen un volumen de agua igual al de la mezcla de reacción, $V_R$.

— Poner en cinco frascos de suero alícuotas de $V_R$ ml de agua, mantenida a 35 °C ± 2 °C. Cerrar los frascos y ponerlos en baño de agua a 35 °C ± 2 °C durante 1 hora para equilibrarlos;

— Conectar el manómetro, dejar que se estabilice y ajustar a cero;

— Introducir la aguja de jeringa a través del cierre de uno de los frascos, abrir la llave hasta que la lectura del manómetro sea cero y cerrar la llave a continuación;

— Repetir el mismo procedimiento con los demás frascos;

— Inyectar en cada frasco 1 ml de aire a 35 °C ± 2 °C. Insertar la aguja (unida al manómetro) a través del cierre de uno de los frascos y dejar que se estabilice la lectura de la presión. Registrar la presión, abrir la llave hasta que la lectura de la presión sea cero y, a continuación, cerrar la llave;

— Repetir el mismo procedimiento con los demás frascos;

— Repetir todo el proceso con 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml y 50 ml de aire;

— Trazar una curva de conversión de la presión (Pa) frente al volumen de gas inyectado (ml). La respuesta del instrumento es lineal a lo largo del intervalo de 0 Pa a 70 000 Pa, y de 0 ml a 50 ml de producción de gas.

▼**M6**

*Apéndice 3*

**Factores identificados que pueden dar lugar a resultados falsos**

a) *Calidad de los cierres*

Se encuentran en el comercio distintos tipos de tapones para los frascos de suero; muchos de ellos, que contienen caucho butílico, pierden su estanqueidad cuando se perforan con una aguja en las condiciones del ensayo. A veces la presión cae muy lentamente una vez que se ha perforado el tapón con la aguja de jeringa. Se recomienda el uso de tapones estancos al gas para evitar las fugas [punto 12, letra b)].

b) *Humedad en la aguja de jeringa*

A veces se acumula la humedad en la aguja de jeringa y en los tubos, lo que se pone de manifiesto por la lectura de una pequeña presión negativa. Para corregir esto, se retira la aguja, se agitan los tubos, se secan con un paño y se pone una nueva aguja [puntos 12, letra c), y 35].

c) *Contaminación con oxígeno*

Los métodos anaeróbicos están expuestos a error debido a la contaminación con oxígeno, lo que puede provocar una producción de gas más baja. En este método, dicha posibilidad debe reducirse al mínimo mediante la utilización de técnicas estrictamente anaeróbicas, incluido el uso de la caja de guantes.

d) *Sustratos gruesos en el lodo*

La producción anaeróbica de gas y la sensibilidad del lodo se ven influidas por los sustratos que se transfieren con el inóculo a los frascos de ensayo. El lodo digerido de digestores anaeróbicos domésticos suele contener todavía materia reconocible, como pelo y residuos vegetales de celulosa, lo que tiende a hacer difícil la toma de muestras representativas. La materia insoluble gruesa puede retirarse tamizando el lodo, lo que facilita la toma de muestras representativas (punto 16).

e) *Sustancias problema volátiles*

Las sustancias problema volátiles se liberarán al espacio libre de los frascos de ensayo. Esto puede dar lugar a la pérdida de una parte del material de ensayo por el sistema durante la evacuación tras las mediciones de la presión, lo que puede dar unos valores demasiado elevados de la $EC_{50}$. El error puede reducirse mediante una adecuada elección de la proporción entre el volumen del espacio libre y el del líquido y evitando la evacuación tras las mediciones de la presión (10).

f) *Producción de gas no lineal*

Si la gráfica de la producción acumulada media de gas frente al tiempo de incubación no es aproximadamente lineal a lo largo del período de 48 h, la exactitud del ensayo puede verse reducida. A fin de superar este problema, puede ser aconsejable utilizar lodo de digestión procedente de una fuente distinta y/o añadir una concentración aumentada de la sustancia problema, de caldo nutritivo, de extracto de levadura y de glucosa (punto 29).

▼M6

*Apéndice 4*

**Aplicación a muestras ambientales con baja concentración de biomasa: fangos, sedimentos, etc., de carácter anaeróbico**

INTRODUCCIÓN

A.1. En general, la actividad microbiana específica (volumen de gas producido por g de sólidos secos) de fangos, sedimentos o suelos anaeróbicos de origen natural es mucho más baja que la de los lodos anaeróbicos procedentes de aguas residuales. Por ello, cuando se trata de medir los efectos inhibidores de las sustancias sobre estas muestras menos activas, es necesario modificar algunas de las condiciones experimentales. Con estas muestras menos activas se dispone en general de dos posibilidades:

a) proceder a un ensayo preliminar modificado (punto 25) con la muestra de fango, suelo, etc., sin diluir a 35 °C ± 2 °C o a la temperatura del lugar de recogida de la muestra, para conseguir una simulación más exacta (como en la parte 1 de ISO 13641);

b) o efectuar el ensayo con un lodo de digestión diluido (1 en 100) para simular la baja actividad que se espera de la muestra ambiental, pero manteniendo la temperatura a 35 °C ± 2 °C (como en la parte 2 de ISO 13641).

A.2. La opción a) puede conseguirse siguiendo el método descrito aquí (equivalente a la parte 1 de la norma ISO 13641), pero es esencial efectuar un ensayo preliminar (punto 25) para determinar las condiciones óptimas, salvo que estas ya se conozcan por ensayos anteriores. La muestra de fango o de sedimento debe homogeneizarse completamente, por ejemplo en un mezclador, y, en caso necesario, diluirse con una pequeña proporción de agua desgasificada de dilución (punto 14), de modo que sea lo suficientemente fluida como para poder transferirse mediante una pipeta de punta ancha o una probeta. En caso de que se considere que pueden ser insuficientes los nutrientes, la muestra de fango puede centrifugarse (en condiciones anaeróbicas) y volver a suspenderse en un medio mineral que contenga extracto de levadura (A.11)

A.3. Opción b): Este planteamiento imita razonablemente bien la baja actividad de las muestras ambientales, pero carece de la alta concentración de sólidos en suspensión presentes en estas muestras. No se conoce el papel de estos sólidos en la inhibición, pero es posible que la reacción entre las sustancias problema y los componentes del fango, junto con la adsorción de las sustancias problema en los sólidos, den lugar a una disminución de la toxicidad de la sustancia problema.

A.4. La temperatura es otro factor importante: para conseguir una simulación estricta, los ensayos deben realizarse a la temperatura del lugar de la muestra, ya que se sabe que hay distintos grupos de bacterias productoras de metano que funcionan a distintos intervalos de temperatura, a saber, los termófilos (~ 30 – 35 °C), los mesófilos (20 – 25 °C) y los psicrófilos (< 20 °C), y que pueden mostrar diferentes pautas de inhibición.

A.5. Duración. En el ensayo general (parte 1), utilizando lodos sin diluir, la producción de gas en los 2-4 días siempre ha sido suficiente, mientras que en la parte 2, con lodos diluidos a la centésima, se produce en ese plazo una cantidad insuficiente o nula de gas en el ensayo interlaboratorios. Madsen *et al*. (1996), en la descripción de este último ensayo, dicen que debe durar al menos 7 días.

**Ensayos efectuados con bajas concentraciones de biomasa (opción b)**

Deben introducirse los siguientes cambios y modificaciones, que se añaden a algunos de los actuales puntos y subpuntos del texto principal, o los sustituyen.

▼**M6**

A.6. En el punto 6 se añade el texto siguiente: Principio del ensayo:

«Esta técnica puede utilizarse con lodo anaerobio diluido a la centésima, en parte para simular la baja actividad de fangos y sedimentos. La temperatura de incubación puede ser de 35 °C o bien la del lugar del que se haya tomado la muestra. Dado que la actividad bacteriana es mucho menor que en el caso del lodo sin diluir, el período de incubación debe ampliarse a 7 días como mínimo.».

A.7. En el punto 12, letra a), se añade el texto siguiente:

«el incubador debe ser capaz de funcionar a temperaturas tan bajas como 15 °C.».

A.8. Se añade un reactivo más tras el punto 13:

«Ácido fosfórico ($H_3PO_4$), 85 % en masa en agua.».

A.9. Se añade el siguiente texto al final del punto 16:

«Se utiliza en el ensayo una concentración final de 0,20 ± 0,05 g/l de sólidos secos totales.».

A.10. Punto 17. Sustrato de ensayo

No se emplea este sustrato, sino que se sustituye por extracto de levadura (véanse los puntos 17; A. 11, A. 12, A. 13).

A.11. Se requiere la presencia de un medio mineral, con oligoelementos, para diluir el lodo anaerobio y, por motivos prácticos, se añade a este medio el sustrato orgánico, extracto de levadura.

Tras el punto 17 se añade el texto siguiente:

«a) Medio mineral de ensayo, con extracto de levadura.

Se prepara a partir de un medio de ensayo concentrado 10 veces [punto 17, letra b); A.12] con una solución de oligoelementos [punto 17, letra c); A. 13]. Utilícese sulfuro de sodio nonahidratado recién suministrado [punto 17, letra b); A. 12] o lávese y séquese antes de su utilización a fin de asegurarse de que dispone de suficiente capacidad reductora. Si el ensayo se lleva a cabo sin utilizar una caja de guantes [punto 12, letra j)], será necesario aumentar la concentración de sulfuro de sodio en la solución madre a 2 g/l (desde 1 g/l). También es posible añadir sulfuro de sodio de una solución madre adecuada a través del tapón de los frascos de ensayo cerrados, ya que este proceso reduce el riesgo de oxidación, hasta obtener una concentración final de 0,2 g/l. Otra posibilidad es utilizar citrato de titanio (III) [punto 17, letra b)]. Se añade a través del tapón de los frascos de ensayo cerrados hasta obtener una concentración de entre 0,8 mmol/l y 1,0 mmol/l. El citrato de titanio (III) es un agente reductor muy eficaz y de baja toxicidad, que se prepara de la forma siguiente: Se disuelven 2,94 g de citrato de trisodio dihidratado en 50 ml de agua de dilución exenta de oxígeno (punto 14) (lo que se traduce en una solución de 200 mmol/l) y se añaden 5 ml de una solución de cloruro de titanio (III) (15 g/100 ml de agua de dilución). Se neutraliza el pH a 7 ± 0,5 con carbonato de sodio y se introduce en un frasco de suero apropiado bajo una corriente de gas nitrógeno. La concentración de citrato de titanio (III) en esta solución madre es igual a 164 mmol/l. El medio de ensayo debe utilizarse inmediatamente o conservarse a 4 °C durante un máximo de un día.

A.12. b) Medio de ensayo concentrado diez veces, elaborado con los siguientes componentes:

| | |
|---|---|
| dihidrogenofosfato de potasio anhidro ($KH_2PO_4$) | 2,7 g |
| hidrogenofosfato de disodio ($Na_2HPO_4$) | 4,4 g |
| (u 11,2 g de dodecahidrato) | 5,3 g |
| cloruro de amonio ($NH_4Cl$) | |

▼**M6**

| | |
|---|---|
| cloruro de calcio dihidratado ($CaC1_2 \cdot 2H_2O$) | 0,75 g |
| cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) | 1,0 g |
| cloruro de hierro (II) tetrahidratado ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) | 0,2 g |
| resazurina (indicador redox) | 0,01 g |
| sulfuro de sodio nonahidratado ($Na_2S \cdot 9H_2O$) | 1,0 g |
| (o citrato de titanio (III)) concentración final | 0,8 mmol/l a 1,0 mmol/l |
| solución de oligoelementos [véase punto 17, letra c); A.13] | 10,0 ml |
| extracto de levadura | 100 g |
| disolver en agua de dilución (punto 14) y enrasar a: | 1 000 ml |

A.13. c) Solución de oligoelementos, preparada con los componentes siguientes:

| | |
|---|---|
| cloruro de manganeso (II) tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) | 0,5 g |
| ácido orto-bórico ($H_3BO_3$) | 0,05 g |
| cloruro de zinc ($ZnCl_2$) | 0,05 g |
| cloruro de cobre (II) ($CuCl_2$) | 0,03 g |
| molibdato de sodio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) | 0,01 g |
| cloruro de cobalto (II) hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) | 1,0 g |
| cloruro de níquel (II) hexahidratado ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) | 0,1 g |
| selenito de disodio ($Na_2SeO_3$) | 0,05 g |
| disolver en agua de dilución (punto 14) y enrasar a: | 1 000 ml». |

A.14. Punto 25: Ensayo preliminar

Es fundamental efectuar un ensayo preliminar como se describe en el punto 24, con la diferencia de que la concentración de sólidos del lodo debe ser una centésima de las concentraciones indicadas, es decir, 0,1 g/l, 0,2 g/l y 0,4 g/l. La duración de la incubación debe ser como mínimo de 7 días.

*Nota:* En el ensayo interlaboratorios (5) el volumen del espacio libre era demasiado alto, con el 75 % del volumen total; debe estar en el intervalo recomendado de entre el 10 % y el 40 %. El criterio pertinente es que el volumen de gas producido en torno al 80 % de inhibición se pueda medir con una precisión aceptable (por ejemplo, de ± 5 % a ± 10 %).

A.15. Puntos 26 a 30: Adición de sustancia problema, inóculo y sustrato

La adición se hace de la misma forma que se describe en estos puntos, pero la solución de sustrato (punto 17) se sustituye por el medio de ensayo más sustrato de extracto de levadura (A.11).

Además, la concentración final de sólidos del lodo seco se reduce de 2 g/l — 4 g/l a 0,2 ± 0,05 g/l (A.9). En el cuadro A.1, que sustituye al cuadro que figura en el punto 29, se indican dos ejemplos de la adición de componentes a la mezcla de ensayo.

A.16. Punto 33: Incubación de los frascos

A causa de la disminución prevista de la velocidad de producción de gas, la incubación se lleva a cabo durante al menos 7 días.

▼**M6**

A.17. Punto 34: Medidas de la presión

Para medir la presión en el espacio libre de los frascos se utiliza el mismo procedimiento que se describe en el punto 34 si hay que conocer las cantidades presentes en la fase gaseosa. Si van a medirse las cantidades totales de $CO_2$ y de $CH_4$, hay que reducir el pH de la fase líquida a alrededor de 2 mediante la inyección de $H_3PO_4$ a cada frasco pertinente y se mide la presión tras 30 minutos de agitación a la temperatura de ensayo. Sin embargo, puede obtenerse más información sobre la calidad del inóculo midiendo la presión en cada frasco antes y después de la acidificación. Por ejemplo, cuando la velocidad de producción de $CO_2$ es mucho más elevada que la de metano, la sensibilidad de las bacterias fermentadoras puede verse alterada o las bacterias metanógenas pueden verse afectadas preferentemente por la sustancia problema.

A.18. Punto 36: Medición del pH

Si se utiliza $H_3PO_4$, han de prepararse especialmente para la medición del pH varios frascos más a los que no se habrá añadido ningún $H_3PO_4$.

*BIBLIOGRAFÍA:*

Madsen, T, Rasmussen, HB; and Nilsson, L (1996), Methods for screening anaerobic biodegradability and toxicity of organic chemicals. Project No.336, Water Quality Institute, Danish Environment Protection Agency, Copenhague.

*Cuadro A.1.*

**Ejemplos de organización del ensayo respecto a los lotes de ensayo**

| Componentes de la mezcla de reacción | Ejemplo 1 | Ejemplo 2 | Orden normal de adición |
|---|---|---|---|
| Concentración en el inóculo preparado (gl/l) | 0,42 | 2,1 | — |
| Volumen de inóculo añadido (ml) | 45 | 9 | 4 |
| Concentración de inóculo en los frascos de ensayo (g/l) | 0,20 | 0,20 | — |
| Volumen de medio de ensayo añadido (ml) | 9 | 9 | 2 |
| Volumen de agua de dilución añadida (ml) | 36 | 72 | 3 |
| Concentración de extracto de levadura en los frascos de ensayo (g/l) | 9,7 | 9,7 | — |
| Volumen de solución madre de sustancia problema (ml) | 3 | 3 | 1 |
| Volumen total de líquido (ml) | 93 | 93 | — |

▼**M6**

*Apéndice 5*

**Definiciones**

A efectos del presente método de ensayo, se aplicarán las siguientes definiciones:

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M6

## C.35. PRUEBA DE TOXICIDAD PARA *LUMBRICULUS* EN SEDIMENTOS Y AGUA CON SEDIMENTO ENRIQUECIDO

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 225 (2007). Los animales endobentónicos que ingieren sedimentos pueden estar muy expuestos a las sustancias ligadas a los sedimentos, por lo que merecen especial atención; véanse, por ejemplo, las referencias (1), (2), (3). Entre estos animales que ingieren sedimentos, los oligoquetos acuáticos desempeñan un importante papel en los sedimentos de los sistemas acuáticos. Por la bioturbación del sedimento y por servir de presa, estos animales pueden influir mucho en la biodisponibilidad de tales sustancias para otros organismos, como, por ejemplo, los peces bentívoros. En contraste con los organismos epibentónicos, los oligoquetos acuáticos endobentónicos (por ejemplo, *Lumbriculus variegatus*) se entierran en el sedimento e ingieren partículas de sedimento por debajo de la superficie de este. Esto hace que los organismos de ensayo queden expuestos a la sustancia problema a través de todas las posibles vías de absorción, como, por ejemplo, contacto con partículas de sedimento contaminadas, o ingestión de tales partículas, pero también a través del agua intersticial y del agua sobrenadante).

2. El presente método de ensayo está diseñado para evaluar los efectos de la exposición prolongada del oligoqueto endobentónico *Lumbriculus variegatus* (Müller) a las sustancias asociadas a los sedimentos. Se basa en los actuales protocolos de ensayo de toxicidad y de bioacumulación del sedimento; véanse por ejemplo las referencias (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10). La descripción del método se refiere a condiciones de ensayo estáticas. La situación de exposición aplicada en el presente método de ensayo es el enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema. El objetivo de enriquecer el sedimento consiste en simular un sedimento contaminado con la sustancia problema.

3. Las sustancias que tienen que someterse a ensayo respecto a organismos que viven en los sedimentos suelen permanecer en este compartimento durante largos plazos. Los organismos que viven en los sedimentos pueden sufrir exposición a través de varias vías. La importancia relativa de cada vía de exposición y el tiempo que tarda cada una de ellas en contribuir a los efectos tóxicos generales dependen de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia correspondiente y de su destino final en el animal. En el caso de las sustancias que se adsorben fuertemente (por ejemplo, con log $K_{ow}$ > 5) o en el de las sustancias que se unen covalentemente con el sedimento, la ingestión de alimentos contaminados puede constituir una vía de exposición significativa. A fin de no subestimar la toxicidad de tales sustancias, los alimentos necesarios para el crecimiento y la reproducción de los organismos de ensayo se añaden al sedimento antes de aplicar la sustancia problema (11). El método de ensayo que se describe es lo suficientemente detallado para que pueda efectuarse el ensayo, sin perjuicio de posibles adaptaciones del diseño experimental en función de las condiciones específicas de cada laboratorio y de las diversas características de las sustancias problema.

4. El método de ensayo tiene por objeto determinar los efectos de la sustancia problema sobre la reproducción y la biomasa de los organismos de ensayo. Los parámetros biológicos medidos son el número total de gusanos supervivientes y la biomasa (peso seco) al final de la exposición. Estos datos se analizan bien aplicando un modelo de regresión para estimar la concentración que causaría un efecto del x % (p. ej., $EC_{50}$, $EC_{25}$, y $EC_{10}$), o bien realizando contrastes estadísticos de hipótesis para determinar la concentración sin efecto observado (NOEC) y la concentración mínima con efecto observado (LOEC).

5. En el capítulo C.27 del presente anexo, «Ensayo de toxicidad para quironómidos en sistemas sedimento-agua con sedimento enriquecido» (6), se aportan muchos datos fundamentales y útiles para la realización del presente método de ensayo de toxicidad en los sedimentos. Por lo tanto, dicho documento ha servido de base sobre la cual se han aportado las modificaciones necesarias para la realización de ensayos de toxicidad en los sedimentos con *Lumbriculus variegatus*. Otros documentos a los que se hace referencia son,

▼M6

por ejemplo, la *Standard Guide for Determination of the Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants by Benthic Invertebrates* de la ASTM (3), los *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates* de la U.S. EPA (7), y la *Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates* de la ASTM (12). Además, la experiencia práctica obtenida durante el ensayo interlaboratorios del método de ensayo [(13), informe del ensayo interlaboratorios] y los datos de la bibliografía han sido importantes fuentes de información para elaborar el presente documento.

CONDICIONES PREVIAS E INFORMACIÓN ORIENTATIVA

6. Antes de empezar el estudio ha de obtenerse información sobre la sustancia problema, como las precauciones de seguridad, las condiciones adecuadas de conservación y los métodos analíticos. En la referencia 14 se ofrecen orientaciones sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan la realización del ensayo.

7. Antes de llevar a cabo el ensayo, debe conocerse la siguiente información acerca de la sustancia problema:

   — nombre común, nombre químico (de preferencia la denominación IUPAC), fórmula estructural, número de registro CAS, pureza;

   — presión de vapor;

   — hidrosolubilidad.

8. La siguiente información adicional se considera útil antes de empezar el ensayo:

   — coeficiente de reparto octanol/agua $K_{ow}$;

   — coeficiente de reparto carbono orgánico-agua, expresado como $K_{oc}$;

   — hidrólisis;

   — fototransformación en el agua;

   — biodegradabilidad;

   — tensión superficial.

9. Antes del inicio del ensayo debe conseguirse información sobre determinadas características de los sedimentos que se vayan a utilizar (7). En los puntos 22 a 25 se encuentran más detalles al respecto.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. Se exponen gusanos de estado fisiológico similar (sincronizadas como se describe en el apéndice 5) a una serie de concentraciones de la sustancia tóxica aplicada a la fase sedimentaria de un sistema sedimento-agua. Deben utilizarse como medio sedimentos artificiales y agua reconstituida. Los recipientes de ensayo sin adición de la sustancia problema sirven de controles. La sustancia problema se introduce en el sedimento en bruto para cada nivel de concentración, con el fin de minimizar la variabilidad entre las réplicas de cada nivel de concentración, y los organismos de ensayo se introducen posteriormente en los recipientes de ensayo en los que las concentraciones de sedimento y agua se habrán equilibrado (véase el punto 29). Los animales de ensayo se exponen a los sistemas sedimento-agua durante un período de 28 días. Teniendo en cuenta el bajo contenido de nutrientes en el sedimento artificial, este debe enriquecerse con una fuente de alimentos (véanse los puntos 22 a 23, y el apéndice 4) para velar por que los gusanos crezcan y se reproduzcan en condiciones controladas. De esta manera se garantiza que los animales de ensayo se exponen a través del agua y del sedimento, así como de sus alimentos.

11. El parámetro preferido para este tipo de estudio es la $EC_x$ (p. ej., $EC_{50}$, $EC_{25}$, y $EC_{10}$; concentración con efecto que afecta al x % de los organismos de ensayo) para la reproducción o la biomasa, comparando con el control.

▼M6

No obstante, ha de observarse que, considerando la elevada incertidumbre de las $EC_x$ bajas (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{25}$) con unos límites de confianza del 95 % extremadamente elevados (véase, p. ej., la referencia 15) y la potencia estadística calculada durante el contraste de hipótesis, se acepta que la $EC_{50}$ es el parámetro más sólido. Por otra parte, la concentración sin efecto observado (NOEC) y la concentración mínima con efecto observado (LOEC) pueden calcularse en relación con la biomasa y con la reproducción, si el diseño del ensayo y los datos permiten estos cálculos (véanse los puntos 34 a 38). El objetivo del estudio, la determinación de $CE_x$ o de la NOEC, determinará el diseño del ensayo.

ENSAYOS DE REFERENCIA

12. Se espera que el comportamiento de los organismos de control demuestre suficientemente la capacidad de un laboratorio para realizar el ensayo y, si se dispone de datos históricos, la repetibilidad del ensayo. Además, pueden llevarse a cabo ensayos de toxicidad de referencia a intervalos regulares con un tóxico de referencia para evaluar la sensibilidad de los organismos de ensayo. Mediante ensayos de toxicidad de referencia de 96 h en el agua se pueden demostrar satisfactoriamente la sensibilidad y el estado de los animales de ensayo (4) (7). En el apéndice 6 y en el informe sobre el ensayo interlaboratorios del método de ensayo (13) se incluye información sobre la toxicidad del pentaclorofenol (PCP) en ensayos completos (28 días de exposición al sedimento enriquecido). La toxicidad aguda, solo en el agua, del PCP se describe, por ejemplo, en la referencia 16. Esta información puede utilizarse para comparar la sensibilidad del organismo de ensayo en ensayos de referencia con PCP como tóxico de referencia. Se ha recomendado utilizar como tóxico de referencia con *L. variegatus* el cloruro de potasio (KCl) o el sulfato de cobre ($CuSO_4$) (4)(7). Hasta la fecha, el establecimiento de criterios de calidad basados en los datos de toxicidad de KCl resulta difícil debido a la falta de datos bibliográficos con *L. variegatus*. En los puntos (17) a (21) se encuentra información sobre la toxicidad del cobre para *L. variegatus*.

VALIDEZ DEL ENSAYO

13. Para que un ensayo sea válido, debe cumplir los siguientes criterios:

— Un ensayo interlaboratorios (13) ha puesto de manifiesto que, en el caso de *Lumbriculus variegatus*, el número medio de gusanos vivos por réplica en los controles debe haberse multiplicado por un factor de al menos 1,8 al final de la exposición en comparación con el número de gusanos por réplica al inicio de la exposición.

— El pH del agua sobrenadante debe estar entre 6 y 9 a lo largo de todo el ensayo.

— La concentración de oxígeno en el agua sobrenadante no debe estar por debajo del 30 % del valor de saturación de aire a la temperatura de ensayo durante el ensayo.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

**Sistema de ensayo**

14. Se recomiendan los sistemas estáticos, sin renovación del agua sobrenadante. Si la proporción entre sedimento y agua (véase el punto 15) es la correcta, una aireación suave será suficiente en principio para mantener la calidad del agua en unos niveles aceptables para los organismos de ensayo (por ejemplo, maximizar los niveles de oxígeno disuelto, minimizar la acumulación de los productos de excreción). Solo en casos excepcionales deben utilizarse sistemas semiestáticos o dinámicos, con renovación intermitente o continua del agua sobrenadante, ya que se supone que la renovación regular del agua sobrenadante afecta al equilibrio químico (por ejemplo, con pérdidas de la sustancia problema del sistema de ensayo).

**Recipientes y equipo del ensayo**

15. La exposición debe llevarse a cabo en vasos de precipitados de, por ejemplo, 250 ml de capacidad y 6 cm de diámetro. Pueden utilizarse otros recipientes de vidrio adecuados que garanticen una altura adecuada de sedimento y de agua sobrenadante. Cada recipiente debe recibir una capa de aproximadamente 1,5-3 cm del sedimento artificial. La proporción de la

▼M6

altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser de 1:4. Los recipientes deben ser de capacidad adecuada para la tasa de carga, es decir, para el número de gusanos de ensayo añadido por unidad de peso del sedimento (véase también el punto 39).

16. Los recipientes de ensayo y demás equipo que hayan de entrar en contacto con la sustancia problema serán íntegramente de vidrio o de otro material químicamente inerte. Se tendrá cuidado de no utilizar, con ninguna parte del equipo, materiales que puedan disolver o adsorber la sustancia problema o lixiviar otras sustancias y tener algún efecto adverso sobre los animales de ensayo. En todos los equipos en contacto con los medios de ensayo debe utilizarse politetrafluoroetileno (PTFE), acero inoxidable o vidrio. En el caso de sustancias orgánicas de las que se sepa que se adsorben al vidrio, puede ser necesario utilizar vidrio silanizado. Será necesario, en estos casos, deshacerse de los equipos una vez usados.

**Especie de ensayo**

17. La especie de ensayo utilizada en este tipo de estudios es el oligoqueto de agua dulce *Lumbriculus variegatus* (Müller). Esta especie es tolerante a una amplia gama de tipos de sedimentos, y es ampliamente utilizada en los ensayos de toxicidad y de bioacumulación en el sedimento [por ejemplo, (3) (5) (7) (9) (13) (15) (16) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35)]. Deben indicarse el origen de los animales de ensayo, la confirmación de la identidad de la especie [p. ej., (36)], así como las condiciones de cultivo. No es necesario identificar la especie antes de realizar cada ensayo si los organismos proceden de un cultivo del propio laboratorio.

**Cultivo de los organismos de ensayo**

18. Con el fin de disponer de un número suficiente de gusanos para la realización de los ensayos de toxicidad en los sedimentos, es útil mantener los gusanos en un cultivo de laboratorio permanente. En el apéndice 5 se encuentran orientaciones sobre los métodos de cultivo en laboratorio de *Lumbriculus variegatus*, así como fuentes de cultivos de inicio. Para más detalles sobre el cultivo de esta especie, véanse las referencias (3), (7), (27).

19. Para garantizar que los ensayos se realizan con animales de la misma especie, es muy recomendable el establecimiento de cultivos de una única especie. Ha de velarse por que los cultivos y especialmente los gusanos utilizados en los ensayos no presenten enfermedades ni anomalías observables.

**Agua**

20. Se recomienda utilizar como agua sobrenadante en las pruebas agua reconstituida con arreglo al capítulo C.1 del presente anexo (37); esta también podrá utilizarse para los cultivos de laboratorio de los gusanos (para la preparación, véase el apéndice 2). En caso necesario, podrá utilizarse agua natural. El agua seleccionada debe ser tal que permita el crecimiento y la reproducción de la especie de ensayo durante los períodos de aclimatación y de ensayo, sin que se observen comportamientos ni aspectos anormales. Se ha demostrado que *Lumbriculus variegatus* sobrevive, crece y se reproduce en este tipo de agua (30), que aporta una normalización máxima de las condiciones de ensayo y de cultivo. Si se utiliza agua reconstituida, debe indicarse su composición y el agua debe caracterizarse antes de usarse, al menos por su pH, contenido de oxígeno y dureza (expresada en mg de $CaCO_3$/l). Puede aportar información útil el análisis del agua antes de usarla, para detectar en ella la presencia de microcontaminantes; véase, por ejemplo, el apéndice 3.

21. El pH del agua sobrenadante debe estar en la banda de 6,0 a 9,0 (véase el punto 13). Si se espera una mayor producción de amoníaco, se considera útil mantener el pH entre 6,0 y 8,0. Para el ensayo de, por ejemplo, ácidos orgánicos débiles, es conveniente ajustar el pH amortiguando el agua utilizada en el ensayo, según lo descrito, por ejemplo, en la referencia (16). La dureza total del agua utilizada en el ensayo debe estar entre 90 y 300 mg $CaCO_3$ por litro en el caso del agua natural. El apéndice 3 resume los criterios adicionales para que el agua de dilución sea aceptable con arreglo a las directrices n$^{o}$ 210 de la OCDE (38).

▼M6

**Sedimento**

22. Dado que es posible que no se disponga a lo largo de todo el año de sedimentos naturales no contaminados procedentes de una fuente particular, y que la presencia de organismos endógenos y de microcontaminantes pueda influir en el ensayo, resulta preferible utilizar sedimento artificial (también denominado formulado, reconstituido o sintético). El uso de un sedimento artificial reduce al mínimo la variabilidad de las condiciones de ensayo, así como la introducción de fauna endógena. El siguiente sedimento artificial se basa en el sedimento artificial según (6), (39) y (40). Se recomienda utilizarlo en este tipo de ensayo [(6), (10), (30), (41), (42), (43)]:

    a) 4-5 % de turba esfágnea (peso seco); es importante utilizar turba en forma de polvo, con un grado medio de descomposición, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 0,5 mm) y secada solo al aire;

    b) 20 ± 1 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

    c) 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco) (arena fina, granulometría ≤ 2 mm, pero > 50 % de las partículas con un tamaño en la banda de 50-200 μm);

    d) agua desionizada, 30–50 % del peso seco del sedimento, además de los componentes del sedimento seco;

    e) carbonato de calcio de calidad químicamente pura ($CaCO_3$) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento;

    f) el contenido de carbono orgánico total (COT) de la mezcla final debe ser del 2 % (± 0,5 %) del peso seco del sedimento, ajustado mediante el empleo de cantidades adecuadas de turba y arena, según las letras a) y c);

    g) alimento, por ejemplo hojas en polvo de ortiga (*Urtica* sp., de conformidad con las normas farmacéuticas, para consumo humano), o una mezcla de hojas en polvo de *Urtica* sp. con alfacelulosa (1:1), en la proporción del 0,4 - 0,5 % de peso seco del sedimento, además de los componentes del sedimento seco; en el apéndice 4 se ofrecen detalles al respecto.

23. Debe conocerse el origen de la turba, del caolín, del alimento y de la arena. Además de la letra g), el capítulo C.27 del presente anexo (6) recoge una lista de materias vegetales alternativas que pueden utilizarse como fuente de nutrientes: hojas deshidratadas de morera (*Morus alba*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinaca (*Spinacia oleracea*) o cereales.

24. La fuente elegida de alimento debe añadirse antes del enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema, o durante el mismo. La fuente elegida de alimento debe permitir al menos la reproducción aceptable de los controles. Puede aportar información útil el análisis del sedimento artificial o de sus componentes antes de la utilización para detectar la presencia de microcontaminantes. En el apéndice 4 se describe un ejemplo de preparación del sedimento artificial. Puede aceptarse también la mezcla de componentes secos si se demuestra que, tras la adición de agua sobrenadante, no se produce separación de los componentes del sedimento (por ejemplo, flotación de partículas de turba), y que la turba o el sedimento están suficientemente acondicionados (véanse también el punto 25 y el apéndice 4). El sedimento artificial debe caracterizarse al menos por el origen de los componentes, la granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), el contenido de carbono orgánico total (COT), el contenido de agua y el pH. La medición del potencial redox es opcional.

25. En caso necesario, por ejemplo con fines de ensayo específicos, pueden también servir como sedimento para el ensayo o el cultivo sedimentos naturales procedentes de lugares exentos de contaminación (3). Sin embargo, si se utiliza sedimento natural, debe caracterizarse al menos por su origen (lugar de recogida), pH y amoníaco del agua intersticial, contenido de carbono orgánico total (COT) y contenido de nitrógeno, granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), y contenido porcentual de agua (7), y debe estar exento de toda contaminación y de otros organismos que pudieran competir con los organismos de ensayo o convertirlos en sus presas. La

▼M6

medición del potencial redox y de la capacidad de intercambio catiónico es opcional. También se recomienda que el sedimento natural, antes de enriquecerse con la sustancia problema, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo. Al final de este período de acondicionamiento, el agua sobrenadante debe retirarse y eliminarse.

26. El sedimento que vaya a utilizarse debe ser tal que permita la supervivencia y la reproducción de los organismos de control durante el período de exposición, sin que se observen comportamientos ni aspectos anormales. Los gusanos de control deben enterrarse en el sedimento, e ingerir este. La reproducción de los controles debe ajustarse al menos al criterio de validez, tal como se describe en el punto 13. La presencia o ausencia de deyecciones en la superficie del sedimento, que indican que los gusanos ingieren el sedimento, debe registrarse y puede ser útil para la interpretación de los resultados del ensayo con respecto a las vías de exposición. Puede obtenerse información adicional sobre la ingestión de sedimento utilizando métodos descritos en las referencias (24), (25), (44) y (45), que especifican la ingestión de sedimento o la selección de partículas en los organismos de ensayo.

27. En las referencias (3), (7) y (12) se describen procedimientos de manipulación de los sedimentos naturales antes de su empleo en el laboratorio. En el apéndice 4 se describen la preparación y la conservación del sedimento artificial recomendado para utilizarse en el ensayo de *Lumbriculus*.

**Aplicación de la sustancia problema**

28. La sustancia problema debe introducirse en el sedimento. Como se espera que la mayoría de las sustancias problema tengan escasa hidrosolubilidad, con el fin de preparar la solución madre deben disolverse en un volumen lo más pequeño posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, acetona, n-hexano, ciclohexano). La solución madre debe diluirse con el mismo disolvente para preparar las soluciones problema. Los principales criterios para la selección de un agente solubilizante adecuado deben ser la toxicidad y la volatilidad del disolvente, y la solubilidad de la sustancia problema en el disolvente elegido. Para cada nivel de concentración debe utilizarse el mismo volumen de la solución correspondiente. La sustancia problema debe introducirse en el sedimento en bruto para cada nivel de concentración, con el fin de minimizar la variabilidad de su concentración entre las réplicas. Cada una de las soluciones de ensayo se mezcla a continuación con arena de cuarzo, según se describe en el punto 22 (por ejemplo, 10 g de arena de cuarzo por recipiente de ensayo). Para que toda la arena de cuarzo quede sumergida, se considera suficiente un volumen de 0,20-0,25 ml/g de arena. A continuación debe evaporarse el disolvente hasta sequedad. Para reducir al mínimo las pérdidas de sustancia problema por coevaporación (por ejemplo, dependiendo de la presión de vapor de la sustancia), la arena recubierta debe utilizarse inmediatamente después del secado. La arena seca se mezcla con la cantidad adecuada de sedimento artificial del correspondiente nivel de concentración. La cantidad de arena aportada por la mezcla de sustancia problema y arena tiene que tenerse en cuenta a la hora de preparar el sedimento (es decir, el sedimento debe prepararse entonces con menos arena). La ventaja principal de este procedimiento es que prácticamente no se introduce disolvente en el sedimento (7). Como alternativa, por ejemplo en caso de sedimento de campo, es posible añadir la sustancia problema a una porción secada y finamente molida del sedimento como se describe anteriormente en relación con la arena de cuarzo, o mezclando la sustancia problema en el sedimento húmedo por agitación, con evaporación posterior de los eventuales agentes solubilizantes empleados. Debe velarse por que la sustancia problema añadida al sedimento se distribuya de forma total y homogénea por el sedimento. Si es necesario, pueden analizarse submuestras para confirmar las concentraciones objetivo en el sedimento, y para determinar el grado de homogeneidad. También puede ser útil analizar submuestras de las soluciones de ensayo para confirmar las concentraciones objetivo en el sedimento. Dado que se utiliza un disolvente para depositar la sustancia problema sobre la arena de cuarzo, debe emplearse un control del disolvente, que se preparará con la misma cantidad de disolvente que los sedimentos de ensayo. Deben indicase el método utilizado para añadir la sustancia problema (enriquecimiento) y los motivos para la elección de un procedimiento concreto distinto

▼M6

de lo descrito más arriba. El método de enriquecimiento podrá adaptarse a las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema, por ejemplo para evitar pérdidas por volatilización durante la fase de enriquecimiento o de equilibrado. En Environment Canada (1995) se encuentran orientaciones adicionales sobre los procedimientos de enriquecimiento (46).

29. Una vez que se ha preparado el sedimento enriquecido, que se ha distribuido entre los recipientes de ensayo replicados, y que se ha completado con agua de ensayo, es aconsejable dejar que la sustancia problema se reparta entre el sedimento y la fase acuosa [véanse, p. ej., las referencias (3), (7) y (9)]. Esto debe efectuarse de preferencia en las mismas condiciones de temperatura y aireación utilizadas en el ensayo. El tiempo adecuado para el reparto equilibrado depende de la sustancia y del sedimento, y puede ser del orden de horas o de días, aunque en ciertos casos raros puede llegar a ser de varias semanas (4 o 5 semanas) [véanse, p. ej., las referencias (27) y (47)]. En este ensayo no se espera hasta alcanzar el equilibrio completo, pero se recomienda respetar un período de reparto de 48 horas a 7 días. De esta manera se reducirá al mínimo el tiempo necesario para la degradación de la sustancia problema. En función del objeto del estudio, por ejemplo cuando se van a simular las condiciones ambientales, el sedimento enriquecido podrá equilibrarse o envejecerse durante un plazo más largo.

30. Al final de este período de equilibrado, hay que tomar muestras al menos del agua sobrenadante y de la masa del sedimento, al menos a la concentración más elevada y a una inferior, para determinar la concentración de la sustancia problema. Estas determinaciones analíticas de la sustancia problema deben permitir el cálculo del balance de masas y la expresión de los resultados sobre la base de las concentraciones iniciales medidas. En general, el muestreo perturba o destruye el sistema sedimento-agua. Por lo tanto, no suele ser posible utilizar las mismas réplicas para la toma de muestras del sedimento y de los gusanos. Hay que preparar recipientes «analíticos» adicionales de dimensiones adecuadas, tratados de la misma manera (incluida la presencia de los organismos de ensayo) pero que no se utilizan para las observaciones biológicas. Las dimensiones del recipiente deben seleccionarse para proporcionar los volúmenes de muestra requeridos por el método analítico. En el punto 53 se recogen datos sobre el muestreo.

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

**Ensayo preliminar**

31. Cuando no se disponga de información sobre la toxicidad de la sustancia problema para *Lumbriculus variegatus*, puede ser útil proceder a un experimento preliminar para determinar el intervalo de concentraciones adecuadas para el ensayo definitivo, y para optimizar las condiciones de realización del ensayo definitivo. Con este fin se utiliza una serie de concentraciones de la sustancia problema, muy diferentes entre sí. Los gusanos se exponen a cada concentración de la sustancia problema durante un plazo (por ejemplo, 28 días como en el ensayo definitivo) que permita la estimación de las concentraciones de ensayo adecuadas; no hace falta utilizar réplicas. Debe observarse y registrarse durante el ensayo preliminar el comportamiento de los gusanos, por ejemplo una tendencia a evitar el sedimento, que pueda deberse a la sustancia problema o al sedimento. No deben utilizarse en el ensayo preliminar concentraciones superiores a 1 000 mg/kg de peso seco del sedimento.

**Ensayo definitivo**

32. En el ensayo definitivo deben utilizarse al menos cinco concentraciones seleccionadas, por ejemplo, sobre la base del resultado del ensayo preliminar de determinación del intervalo (punto 31), según se describe en los puntos 35, 36, 37 y 38.

▼M6

33. Además de la serie de ensayo se prepara un control (sobre las réplicas, véanse los puntos 36, 37 y 38) con todos los componentes salvo la sustancia problema. Si se utiliza algún agente solubilizante para la aplicación de la sustancia problema, no debe tener ningún efecto significativo sobre los organismos de ensayo, lo cual ha de demostrarse mediante un control adicional que solo contenga disolvente.

**Diseño del ensayo**

34. El diseño del ensayo se refiere a la selección del número de concentraciones de ensayo y al intervalo entre las mismas, al número de recipientes por concentración y al número de gusanos añadidos a cada recipiente. Los diseños para la estimación de $EC_x$, para la estimación de la NOEC, y para realizar un ensayo límite se describen en los puntos 35, 36, 37 y 38.

35. La concentración con efecto (por ejemplo, $EC_{50}$ $EC_{25}$, $EC_{10}$) y el rango de concentraciones a las que resulta interesante el efecto de la sustancia problema tienen que estar abarcados entre las concentraciones incluidas en el ensayo. Debe evitarse extrapolar muy por debajo de la concentración mínima que afecta a los organismos de ensayo o por encima de la mayor concentración estudiada. Si —en casos excepcionales— se lleva a cabo tal extrapolación, es preciso dar una explicación completa en el informe.

36. Si ha de estimarse la $EC_x$, deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones y un mínimo de tres réplicas por cada concentración; se recomienda utilizar seis réplicas para el control o —en caso de que se utilice— para el control del disolvente, a fin de mejorar la estimación de la variabilidad del control. En cualquier caso, es recomendable utilizar suficientes concentraciones de ensayo para poder hacer una buena estimación del modelo. El factor entre concentraciones no debe ser mayor de dos (puede permitirse una excepción en los casos en que la pendiente de la curva dosis-respuesta sea poco pronunciada). El número de réplicas de cada tratamiento puede reducirse si aumenta el número de concentraciones de ensayo con respuestas en el intervalo del 5–95 %. El aumento del número de réplicas o la reducción del tamaño del intervalo entre concentraciones de ensayo tiende a estrechar los intervalos de confianza del ensayo.

37. Si hay que estimar los valores de LOEC/NOEC, deben utilizarse al menos cinco concentraciones de ensayo con un mínimo de cuatro réplicas (se recomiendan seis réplicas para el control o —en caso de que se utilice— para el control del disolvente, a fin de mejorar la estimación de la variabilidad del control), y el factor entre concentraciones no debe exceder de dos. En el apéndice 6 figura información sobre la potencia estadística constatada durante los contrastes de hipótesis en el ensayo interlaboratorios del método de ensayo.

38. Puede llevarse a cabo un ensayo límite (con una sola concentración de ensayo y controles) si no se esperan efectos a concentraciones de hasta 1 000 mg/kg de peso seco de sedimento (p. ej., a partir de datos de un ensayo preliminar de determinación del intervalo), o si el ensayo con una sola concentración es adecuado para confirmar un valor NOEC de interés. En este último caso, debe incluirse en el informe del ensayo una justificación detallada de la selección de la concentración límite. La finalidad del ensayo límite es someter a ensayo una concentración suficientemente elevada como para permitir a los responsables excluir cualquier efecto tóxico de la sustancia problema, y el límite se establece a una concentración que no se espera encontrar en la realidad en ninguna situación. Se recomienda la concentración de 1 000 mg/kg (peso seco). Generalmente hacen falta al menos seis réplicas tanto de las unidades de tratamiento como de las de control. En el apéndice 6 figura información sobre la potencia estadística constatada durante los contrastes de hipótesis en el ensayo interlaboratorios del método de ensayo.

**Condiciones de exposición**

*Organismos de ensayo*

39. La prueba se lleva a cabo con al menos diez gusanos en cada réplica utilizada para la determinación de los parámetros biológicos. Este número de gusanos corresponde aproximadamente a 50-100 mg de biomasa húmeda. Suponiendo un contenido seco del 17,1 % (48), esto resulta aproximadamente en 9-17 mg de biomasa seca por recipiente. La EPA estadounidense

▼M6

(2000 (7)) recomienda utilizar una tasa de carga inferior o igual a 1:50 (biomasa seca: COT). Para el sedimento artificial descrito en el punto 22, esto representa aproximadamente 43 g de sedimento (peso seco) por diez gusanos con un contenido de carbono orgánico total (COT) de un 2,0 % de sedimento seco. En los casos en que se utilicen más de diez gusanos por recipiente, el importe del sedimento y del agua sobrenadante debe ajustarse en consecuencia.

40. Todos los gusanos empleados en un ensayo deben proceder de la misma fuente, y su estado fisiológico debe ser similar (véase el apéndice 5). Deben seleccionarse gusanos de tamaño similar (véase el punto 39). Se recomienda pesar una submuestra del lote o población de gusanos antes del ensayo, para calcular el peso medio.

41. Se toman del cultivo los gusanos que se vayan a utilizar en un ensayo (véanse más detalles en el anexo 5). Se toman animales grandes (adultos) que no muestren signos de fragmentación reciente y se transfieren a placas de vidrio (p. ej., placas Petri) que contengan agua limpia. A continuación se sincronizan según el método descrito en el apéndice 5. Después de la regeneración durante un período de 10 a 14 días, deben utilizarse para el ensayo gusanos completos de tamaño similar, que naden o se arrastren activamente tras un suave estímulo mecánico. Si las condiciones de ensayo son diferentes de las condiciones de cultivo (por ejemplo, en cuanto a la temperatura, régimen de luz y agua sobrenadante), una fase de aclimatación de 24 h a la temperatura, régimen de luz, y con la misma agua sobrenadante que en el ensayo debe ser suficiente para que los gusanos se adapten a las condiciones de ensayo. Los oligoquetos adaptados deben asignarse aleatoriamente a los recipientes de ensayo.

*Alimentación*

42. Dado que se añade alimento al sedimento antes de la aplicación de la sustancia problema (o durante la misma), los gusanos no reciben alimentación adicional durante el ensayo.

*Luz y temperatura*

43. El fotoperíodo en el cultivo y el ensayo suele ser de 16 horas (3), (7). La intensidad luminosa debe mantenerse baja (por ejemplo, de 100 a 500 lx) para imitar las condiciones naturales en la superficie del sedimento, y se mide al menos una vez durante el período de exposición. La temperatura debe ser de 20 °C ± 2 °C en toda la duración del ensayo. En una determinada fecha de medición, la diferencia de temperatura entre los recipientes de ensayo no debe ser superior a ± 1 °C. Los recipientes de ensayo deben colocarse en la incubadora de ensayo o en la zona de ensayo de forma aleatoria, por ejemplo con el fin de minimizar los sesgos de reproducción debido a la ubicación del recipiente.

*Aireación*

44. El agua sobrenadante de los recipientes de ensayo debe airearse suavemente (por ejemplo, 2 - 4 burbujas por segundo) mediante una pipeta Pasteur situada aprox. 2 cm por encima de la superficie del sedimento, con el fin de reducir al mínimo la perturbación de este. Se debe procurar que la concentración de oxígeno disuelto no caiga por debajo del 30 % del valor de saturación de aire). El suministro de aire debe medirse y, si fuera necesario, ajustarse al menos una vez al día durante los días laborables.

**Medición de la calidad del agua**

45. Deben medirse en el agua sobrenadante los siguientes parámetros de calidad del agua:

| | |
|---|---|
| Temperatura: | al menos en un recipiente de ensayo de cada nivel de concentración y en un recipiente de los controles una vez por semana y al inicio y al final del período de exposición; si es posible, la temperatura en el medio ambiente (aire ambiente o baño de agua) podrá registrarse también, por ejemplo a intervalos de una hora; |

▼M6

| | |
|---|---|
| Concentración de oxígeno disuelto: | al menos en un recipiente de ensayo de cada nivel de concentración y en un recipiente de los controles una vez por semana y al inicio y al final del período de exposición; expresado en mg/l y en % del valor de saturación de aire; |
| Suministro de aire: | debe medirse por lo menos una vez al día durante los días laborables y, si fuera necesario, ajustarse; |
| pH: | al menos en un recipiente de ensayo de cada nivel de concentración y en un recipiente de los controles una vez por semana y al inicio y al final del período de exposición; |
| Dureza total del agua: | al menos en una réplica de los controles y en un recipiente de ensayo del nivel más elevado de concentración al inicio y al final del período de exposición; expresada en mg/l $CaCO_3$; |
| Contenido total de amoníaco: | al menos en una réplica de los controles y en un recipiente de ensayo de cada nivel de concentración al inicio del período de exposición y, posteriormente, 3 veces por semana; expresado en mg/l $NH_4^+$ o $NH_3$ o en N amoniacal total. |

Si la medición de los parámetros de calidad del agua exige la extracción de muestras significativas de agua de los recipientes, puede ser aconsejable establecer recipientes aparte para las mediciones de la calidad del agua, a fin de no alterar la relación agua-sedimento en volumen.

**Observaciones biológicas**

46. Durante la exposición, hay que observar los recipientes de ensayo a fin de comprobar visualmente las eventuales diferencias de comportamiento de los gusanos (por ejemplo, tendencia a evitar el sedimento, deyecciones visibles en la superficie del sedimento) en comparación con los controles. Las observaciones se registrarán.

47. Al final del ensayo se examina cada réplica (pueden excluirse del examen los recipientes adicionales reservados para los análisis químicos). Debe utilizarse un método conveniente para recuperar la totalidad de los gusanos del recipiente de ensayo. Debe tenerse cuidado para recuperar todos los gusanos sin lesionarlos. Un método posible es el tamizado de los gusanos a partir del sedimento. Puede utilizarse una malla de acero inoxidable de una luz adecuada. Se decanta con cuidado la mayor parte del agua sobrenadante, y el agua restante se agita con el sedimento para producir un lodo, que puede pasarse a través del tamiz. Con una luz de 500 μm, la mayoría de las partículas del sedimento pasará el tamiz con gran rapidez; sin embargo, el cribado debe hacerse con rapidez, a fin de impedir que los gusanos se arrastren al interior o a través de la luz. Con una luz de 250 μm se impedirá a los gusanos arrastrarse al interior o a través de la luz; no obstante, se debe tener cuidado para que quede retenida en el tamiz la menor cantidad posible de partículas del sedimento. El lodo tamizado de cada uno de los recipientes replicados puede pasarse por el tamiz una segunda vez a fin de garantizar que se recuperan todos los gusanos. Un método alternativo podría ser el calentamiento del sedimento colocando los recipientes de ensayo en un baño de agua a 50-60 °C; los gusanos saldrán del sedimento, y podrán recogerse de su superficie mediante el uso de una pipeta de boca ancha pulida al fuego. Otro método alternativo podría consistir en obtener un lodo del sedimento y verterlo en una bandeja poco profunda de tamaño adecuado. A partir de la capa somera de lodo, es posible recoger los gusanos con una aguja de acero o unas pinzas de relojero (que deben utilizarse más bien como horquilla que como pinzas, para evitar dañar a los gusanos) y transferirlos a agua limpia. Después de extraer los gusanos del lodo de sedimento, se lavan en el medio de ensayo y se cuentan.

48. Con independencia del método utilizado, los laboratorios deben demostrar que su personal es capaz de recuperar una media del 90 % como mínimo de

▼M6

los organismos del conjunto del sedimento. Por ejemplo, podría añadirse al sedimento de los controles o al sedimento de ensayo un cierto número de organismos de ensayo, y determinarse la recuperación después de 1 h (7).

49. Debe registrarse y evaluarse el número total de ejemplares vivos y muertos por réplica. Se consideran muertos los gusanos que pertenecen a los siguientes grupos:

a) no presentan ninguna reacción después de un suave estímulo mecánico;

b) presentan signos de descomposición [en combinación con la letra a)];

c) falta cierto número de gusanos.

Por otra parte, los gusanos vivos pueden asignarse a uno de los tres grupos siguientes:

a) gusanos completos grandes (adultos) sin regiones corporales regeneradas;

b) gusanos completos con regiones corporales regeneradas, de color más claro (es decir, con la parte posterior nueva, con la parte anterior nueva, o con las partes anterior y posterior nuevas);

c) gusanos incompletos (es decir, gusanos fragmentados recientemente con regiones corporales no regeneradas).

Estas observaciones adicionales no son obligatorias, pero pueden usarse para mejorar la interpretación de los resultados biológicos [por ejemplo, un alto número de gusanos asignados al grupo c) puede indicar un retraso de la reproducción o de la regeneración en un determinado tratamiento]. Además, debe registrarse si se observa alguna diferencia de aspecto (por ejemplo, lesiones en el tegumento, secciones corporales edematosas) entre los gusanos tratados y los de control.

50. Inmediatamente después del recuento o evaluación, los gusanos vivos encontrados en cada réplica se transfieren a platillos de balanza secos, previamente tarados y etiquetados (un platillo por réplica), y se matan poniendo una gota de etanol por platillo. Los platillos de balanza se colocan en una estufa a 100 ± 5 °C y se dejan secar durante una noche, tras lo cual se pesan, después de enfriarse en un desecador, y se determina el peso seco de los gusanos (de preferencia en g, con una precisión de al menos cuatro decimales).

51. Además del peso seco total, puede determinarse el peso seco sin cenizas, como se describe en (49), para tener en cuenta los componentes inorgánicos procedentes del sedimento ingerido presente en el aparato digestivo de los gusanos.

52. La biomasa se determina como biomasa total por réplica, incluidas los gusanos adultos y jóvenes. Los gusanos muertos no deben tenerse en cuenta para la determinación de la biomasa por réplica.

**Verificación de las concentraciones de la sustancia problema**

*Muestreo*

53. Las muestras para el análisis químico de la sustancia problema deben tomarse al menos a la concentración más elevada y a una inferior, al menos al final de la fase de equilibrado (antes de añadir los organismos de ensayo) y al final del ensayo. Deben muestrearse para el análisis al menos el sedimento en bruto y el agua sobrenadante. Deben tomarse al menos dos muestras por matriz y tratamiento, en cada fecha de muestreo. Una de las dos muestras duplicadas puede almacenarse como reserva (para analizarse, por ejemplo, en el caso de que los análisis iniciales se sitúen fuera del intervalo del ± 20 % de la concentración nominal). En caso de propiedades químicas específicas, por ejemplo si se espera una rápida degradación de la sustancia

▼M6

problema, se podrá modificar el calendario de los análisis (por ejemplo, tomar muestras con mayor frecuencia, analizar más niveles de concentración) sobre la base de un juicio experto. En tal caso podrán tomarse muestras en fechas de muestreo intermedias (por ejemplo, el día 7 tras el inicio de la exposición).

54. Deben tomarse muestras del agua sobrenadante, decantándola con cuidado o haciendo sifón, con objeto de reducir al mínimo la perturbación del sedimento. Debe señalarse el volumen de las muestras.

55. Después de que se haya retirado el agua sobrenadante, el sedimento debe homogeneizarse y transferirse a un recipiente adecuado. Se registra el peso de la muestra de sedimento húmedo.

56. Si se requiere además el análisis de la sustancia problema en el agua intersticial, las muestras de sedimento homogeneizadas y pesadas deben centrifugarse para obtener el agua intersticial. Por ejemplo, aproximadamente 200 ml del sedimento húmedo pueden cargarse en vasos de centrífuga de 250 ml. A continuación se centrifugan las muestras sin filtrar para aislar el agua intersticial, por ejemplo a 10 000 ± 600 × g durante 30 a 60 minutos a una temperatura no superior a la temperatura utilizada en el ensayo. Después de centrifugar, se decanta o se pipetea el sobrenadante, teniendo cuidado de no introducir partículas del sedimento, y se registra el volumen. Se registra el peso del precipitado de sedimento restante. Así se puede facilitar la estimación del balance de masas o la recuperación de la sustancia problema en el sistema agua-sedimento, si se determina en cada fecha de muestreo el peso del sedimento seco. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial debido a que el tamaño de la muestra es demasiado pequeño.

57. A falta de su análisis inmediato, todas las muestras deben conservarse siguiendo un método adecuado como, p. ej., en las condiciones de almacenamiento recomendadas para una degradación mínima de la sustancia problema particular (por ejemplo, las muestras tomadas del medio ambiente suelen conservarse a – 18 °C en la oscuridad). Antes de empezar el estudio ha de obtenerse información sobre las condiciones adecuadas de almacenamiento de la sustancia problema particular (por ejemplo, la duración y la temperatura del almacenamiento, los procedimientos de extracción, etc.).

*Métodos analíticos*

58. Como la totalidad del procedimiento se rige principalmente por la exactitud, la precisión y la sensibilidad del método analítico utilizado para la sustancia problema, es necesario controlar experimentalmente que la precisión y la reproducibilidad del análisis químico, así como la recuperación de la sustancia problema de las muestras tanto de agua como de sedimento, son satisfactorias para el método particular, al menos a los niveles de concentración de ensayo más elevado y más bajo. Ha de comprobarse también que la sustancia problema no es detectable en las cámaras de control a concentraciones superiores al límite de cuantificación. En caso necesario, hay que corregir las concentraciones nominales para tener en cuenta las recuperaciones de la sustancia introducida en recipientes de control de calidad (por ejemplo, cuando la recuperación esté fuera del 80 - 120 % de la cantidad introducida). Todas las muestras deben manipularse a lo largo de todo el ensayo de manera que se minimicen la contaminación y las pérdidas (por ejemplo, derivadas de la adsorción de la sustancia problema al dispositivo de muestreo).

59. Deben registrarse y consignarse en el informe la recuperación de la sustancia problema, el límite de cuantificación y el límite de detección en el sedimento y en el agua.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

60. Las principales variables de respuesta obligatorias del ensayo que han de evaluarse estadísticamente son la biomasa y el número total de gusanos por réplica. Con carácter facultativo, también pueden evaluarse la reproducción (como aumento del número de gusanos) y el crecimiento (como incremento de la biomasa seca). En este caso, debe obtenerse una estimación del peso seco de los gusanos al comienzo de la exposición mediante, por ejemplo, la medición del peso seco de una submuestra representativa del lote de gusanos sincronizados que se vaya a utilizar en el ensayo.

▼M6

61. Aunque la mortalidad no es un parámetro de este ensayo, debe evaluarse en la medida de lo posible. Con el fin de estimar la mortalidad, se consideran muertos los gusanos que no responden a un suave estímulo mecánico o que muestran signos de descomposición, así como los gusanos que falten. La mortalidad debe al menos registrarse y tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados del ensayo.

62. Las concentraciones con efecto deben expresarse en mg/kg de peso seco del sedimento. Si la recuperación de la sustancia problema medida en el sedimento, o en el sedimento y el agua sobrenadante al comienzo de la exposición, se sitúa entre el 80 y el 120 % de las concentraciones nominales, las concentraciones con efecto ($EC_x$, NOEC, LOEC) podrán expresarse sobre la base de las concentraciones nominales. Si la recuperación se aparta de las concentraciones nominales en más del ± 20 % de las concentraciones nominales, las concentraciones con efecto ($EC_x$, NOEC, LOEC) deberán basarse en las concentraciones medidas al inicio de la exposición, por ejemplo teniendo en cuenta el balance de masas de la sustancia problema en el sistema de ensayo (véase el punto 30). En estos casos, puede obtenerse información adicional del análisis de las soluciones madre o de aplicación con el fin de confirmar que los sedimentos de ensayo se han preparado correctamente.

**$EC_x$**

63. Los valores de $EC_x$ para los parámetros descritos en el punto 60 se calculan utilizando métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, análisis de probit, función logística o de Weibull, método de Spearman-Karber recortado o interpolación simple). En las referencias (15) y (50) se dan orientaciones sobre la evaluación estadística. Se obtiene una $EC_x$ insertando en la ecuación encontrada un valor correspondiente al x % de la media del control. Para calcular la $EC_{50}$ o alguna otra $EC_x$, las medias por tratamiento ($\overline{X}$) deben someterse a análisis de regresión.

**NOEC/LOEC**

64. Cuando se pretende determinar la NOEC/NOEL mediante análisis estadístico, es necesario disponer de estadísticas por recipiente (se considera que cada uno de los recipientes es una réplica). Se deben utilizar métodos estadísticos apropiados. En general, los efectos adversos de la sustancia problema en comparación con el control se investigan utilizando contrastes de hipótesis unilaterales (más pequeños) a $p \leq 0,05$. En los puntos siguientes se presentan ejemplos. En las referencias (15) y (50) se dan orientaciones sobre la selección de métodos estadísticos adecuados.

65. La distribución normal de los datos puede comprobarse, por ejemplo, con la prueba de la bondad del ajuste de Kolmogorov-Smirnov, la prueba de la relación del intervalo a la desviación típica (prueba R/s), o la prueba de Shapiro-Wilk) (bilateral, $p \leq 0,05$). Para comprobar la homogeneidad de la varianza pueden utilizarse las pruebas de Cochran, de Levene o de Bartlett (bilateral, $p \leq 0,05$). Si se cumplen los requisitos previos de los procedimientos de ensayos paramétricos (normalidad, homogeneidad de la varianza) puede efectuarse un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido de pruebas de comparación múltiple. Las comparaciones de pares (p. ej., prueba t de Dunnett) o las pruebas de tendencia de ajuste secuencial (p. ej., prueba de Williams) pueden utilizarse para determinar si existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los controles y las distintas concentraciones de la sustancia problema. De lo contrario, para determinar la LOEC y la NOEC deben utilizarse métodos no paramétricos (p. ej., prueba U de Bonferroni según Holm o prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra).

**Ensayo límite**

66. Si se realiza un ensayo límite (comparación del control y de un solo tratamiento) y se cumplen los requisitos previos de procedimientos de ensayos paramétricos (normalidad, homogeneidad), pueden evaluarse las respuestas métricas (número total de gusanos, y biomasa como peso seco de gusanos) con la prueba de Student (prueba t). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales (prueba t de Welch) o una prueba no paramétrica, tal como la prueba U de Mann-Whitney. En el apéndice 6 figura información sobre la potencia estadística constatada durante los contrastes de hipótesis en el ensayo interlaboratorios del método.

▼M6

67. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los controles (control y control del disolvente), las réplicas de cada control pueden someterse a ensayo según lo descrito para el ensayo límite. En caso de que tales ensayos no detecten diferencias significativas, pueden agruparse todas las réplicas de control y de control del disolvente. En caso contrario, todos los tratamientos deben compararse con el control del disolvente.

**Interpretación de los resultados**

68. Los resultados se interpretarán con precaución si ha habido alguna desviación respecto al presente método de ensayo y cuando las concentraciones medidas de las soluciones de ensayo se encuentren a niveles cercanos al límite de detección del método analítico utilizado. Deberán indicarse las eventuales desviaciones respecto al presente método de ensayo.

**Informe del ensayo**

69. El informe del ensayo debe recoger, como mínimo, la siguiente información:

— *Sustancia problema:*

— datos de identificación de la sustancia (nombre común, nombre químico, fórmula estructural, número CAS, etc.), incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia problema; fuente de la sustancia problema, identidad y concentración de los eventuales disolventes utilizados;

— cualquier información disponible sobre la naturaleza física y propiedades fisicoquímicas obtenida antes del inicio del ensayo [por ejemplo, hidrosolubilidad, presión de vapor, coeficiente de reparto en el suelo (o en el sedimento, si se conoce), log $K_{ow}$, estabilidad en el agua, etc.];

— *Especie de ensayo:*

— denominación científica, fuente, eventuales tratamientos previos, aclimatación, condiciones de cultivo, etc.;

— *Condiciones del ensayo:*

— procedimiento de ensayo aplicado (p. ej., estático, semiestático o dinámico);

— diseño del ensayo (p. ej., número, material y tamaño de las cámaras de ensayo, volumen de agua por recipiente, masa y volumen del sedimento por recipiente, (en caso de procedimiento dinámico o semiestático: tasa de renovación del volumen de agua), eventual aireación antes del ensayo y durante el mismo, número de réplicas, número de gusanos por réplica al inicio de la exposición, número de concentraciones de ensayo, duración de los períodos de acondicionamiento, de equilibrado y de exposición, frecuencia del muestreo);

— altura del sedimento y del agua sobrenadante;

— método de pretratamiento y de enriquecimiento o aplicación de la sustancia problema;

— concentraciones nominales de ensayo, información detallada sobre el muestreo para el análisis químico, y métodos analíticos con los que se han determinado las concentraciones de la sustancia problema;

— características de los sedimentos según se describen en los puntos 24-25, y las demás medidas eventualmente realizadas; preparación del sedimento artificial;

— preparación del agua de ensayo (si se utiliza agua reconstituida) y características (concentración de oxígeno, pH, conductividad, dureza, y cualquier otra medición realizada) antes del inicio del ensayo;

— información detallada sobre la alimentación de los animales, incluidos el tipo de alimento, la preparación, la cantidad y el régimen alimentario;

▼**M6**

— intensidad luminosa y fotoperíodo(s);

— métodos utilizados para la determinación de todos los parámetros biológicos (p. ej., muestreo, inspección, pesada de los organismos de ensayo) y todos los parámetros abióticos (p. ej., parámetros de calidad del agua y del sedimento);

— volúmenes o pesos de todas las muestras para el análisis químico;

— información pormenorizada sobre el tratamiento de todas las muestras para el análisis químico, incluidos datos de la preparación, almacenamiento, métodos de adición de la sustancia problema (enriquecimiento), extracción y procedimientos analíticos (y precisión del análisis) de la sustancia problema, y recuperaciones de la sustancia problema;

— *Resultados:*

— calidad del agua en los recipientes de ensayo (pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, dureza, concentraciones de amoniaco, y cualquier otra medición realizada);

— contenido de carbono orgánico total (COT), relación de peso seco a peso húmedo, pH del sedimento, y cualquier otra medición realizada;

— número total y, si se ha determinado, número de gusanos completos e incompletos en cada cámara de ensayo al final del ensayo;

— peso seco de los gusanos de cada cámara de ensayo al final del ensayo y, si se mide, peso seco de una submuestra de los gusanos al inicio del ensayo;

— eventuales comportamientos anormales observados en comparación con los controles (por ejemplo, tendencia a evitar el sedimento, presencia o ausencia de deyecciones);

— eventual mortalidad observada;

— estimación de los parámetros de toxicidad (p. ej., $EC_x$, NOEC o LOEC), y métodos estadísticos empleados para su determinación;

— concentraciones de ensayo nominales, concentraciones de ensayo medidas y resultados de todos los análisis efectuados para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo;

— eventuales desviaciones respecto de los criterios de validez;

— *Evaluación de los resultados:*

— cumplimiento por los resultados de los criterios de validez recogidos en el punto 13;

— discusión de los resultados, incluida la influencia que puedan tener sobre ellos las eventuales desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) CE (2003). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I - IV. Oficina de Publicaciones Oficiales de la CE (Comisión Europea), Luxemburgo.

(2) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. Monografías de la OCDE nº 60. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos, París.

▼**M6**

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. En: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) ASTM International (2002). Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E1706-00. En: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(5) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(6) Capítulo C.27 del presente anexo, «Ensayo de toxicidad para quironómidos en sistemas sedimento-agua con sedimento enriquecido».

(7) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(8) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. Diciembre de 1997.

(9) Hill, I.R., Matthiessen, P., Heimbach, F. (eds), 1993, Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From the SETAC-Europe Workshop On Sediment Toxicity Assessment, 8-10 November 1993, Renesse (NL).

(10) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Editado por M. Streloke y H. Köpp. Berlín 1995.

(11) Riedhammer C. & B. Schwarz-Schulz (2001). The Newly Proposed EU Risk Assessment Concept for the Sediment Compartment. J. Soils Sediments 1(2), 105-110.

(12) ASTM International (2004). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1391-03.

(13) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. En cooperación con R. Nagel y B. Karaoglan. Informe para la Agencia Medioambiental Federal de Alemania (Umweltbundesamt Berlin), R & D No.: 202 67 429.

(14) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(15) Environment Canada (2003). Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests; fifth draft, marzo de 2003; Report EPS 1/RM/___

(16) Nikkilä A., Halme A., Kukkonen J.V.K. (2003). Toxicokinetics, toxicity and lethal body residues of two chlorophenols in the oligochaete worm, *Lumbriculus variegatus*, in different sediments. Chemosphere 51: 35-46.

(17) Baily H.C., & Liu D.H.W. (1980). *Lumbriculus variegatus*, a Benthic Oligochaete, as a Bioassay Organism. p. 205-215. En J.C. Eaton, P.R. Parrish, and A.C. Hendricks (eds). Aquatic Toxicology, ASTM STP 707. American Society for Testing and Materials.

▼**M6**

(18) Chapman K. K., Benton M. J., Brinkhurst R. O. & Scheuerman P. R. (1999). Use of the aquatic oligochaetes *Lumbriculus variegatus* and *Tubifex tubifex* for assessing the toxicity of copper and cadmium in a spiked-artificial-sediment toxicity test. Environmental Toxicology. 14(2): 271-278.

(19) Meyer J.S., Boese C.J. & Collyard S.A. (2002). Whole-body accumulation of copper predicts acute toxicity to an aquatic oligochaete (*Lumbriculus variegatus*) as pH and calcium are varied. Comp. Biochem. Physiol. Part C 133:99-109.

(20) Schubauer-Berigan M.K., Dierkes J.R., Monson P.D. & Ankley G.T. (1993). pH-dependent toxicity of cadmium, copper, nickel, lead and zinc to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 12(7):1261-1266.

(21) West, C.W., V.R. Mattson, E.N. Leonard, G.L. Phipps & G.T. Ankley (1993). Comparison of the relative sensitivity of three benthic invertebrates to copper-contaminated sediments from the Keweenaw Waterway. Hydrobiol. 262:57-63.

(22) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1885-1894.

(23) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(24) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(25) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(26) Landrum, P.F., Gedeon, M.L., Burton, G.A., Greenberg. M.S., & Rowland, C.D. (2002). Biological Responses of *Lumbriculus variegatus* Exposed to Fluoranthene-Spiked Sediment. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 42: 292-302.

(27) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(28) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of non-ionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 872-885.

(29) Rodríguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. En: A. Mudroch, J.M. Azcue & P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(30) Liebig, M., Egeler, Ph. Oehlmann, J., & Knacker, Th. (2005). Bioaccumulation of $^{14}$C-17α-ethinylestradiol by the oligochaete *Lumbriculus variegatus* in artificial sediment. Chemosphere 59, 271-280.

(31) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(32) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

▼**M6**

(33) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

(34) Dermott R. & Munawar M. (1992). A simple and sensitive assay for evaluation of sediment toxicity using *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 235/236: 407-414.

(35) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(36) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. No. 22.

(37) Capítulo C.1 del presente anexo: Toxicidad aguda en peces.

(38) OCDE (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OCDE, París.

(39) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, 835-852.

(40) Meller, M., P. Egeler, J. Roembke, H. Schallnass, R. Nagel and B. Streit. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulphate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety, 39, 10-20.

(41) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes», 26-27.04.1999, Hochheim/Main, Germany. Report on the R+D-project No. 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlín.

(42) Suedel, B.C. and Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, 1163-1175.

(43) Naylor, C. and C. Rodrigues. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291-3303.

(44) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of *Limnodrilus hoffmeisteri* using two different methods. Hydrobiologia 11, 181-184.

(45) Martínez-Madrid, M., Rodríguez, P., Pérez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. *Tubifex tubifex* (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, 111-124.

(46) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(47) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Technol. 23, 588-595.

(48) Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J. & Cook, P.M. (1996). Gut content and clearance for three species of freshwater invertebrates. Environ. Toxicol. Chem. 15, 223-228.

(49) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1244-1249.

▼M6

(50) OCDE 2006. Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. OECD Series on Testing and Assessment No. 54, OCDE, París, Francia.

(51) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Coblenza, Alemania, pp. 107-119.

**Bibliografía adicional sobre procedimientos estadísticos:**

Dunnett, C.W. (1955). A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. Amer. Statist. Ass. J. 50, 1096-1121.

Dunnett, C.W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20, 482-491.

Finney, D.J. (1971). Probit Analysis (3rd ed.), pp. 19-76. Cambridge Univ. Press.

Finney, D.J. (1978). Statistical Method in Biological Assay. Charles Griffin & Company Ltd, Londres.

Hamilton, M.A., R.C. Russo and R.V. Thurston. (1977). Trimmed Spearman-Karber Method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol. 11(7), 714-719; Corrección: Environ. Sci. Technol. 12 (1998), 417.

Holm, S. (1979). A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J. Statist. 6, 65-70.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. (1981) Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. 2nd edition. W.H. Freeman and Company. Nueva York,

Miller, R.G., Jr. (1986). Beyond ANOVA, basics of applied statistics. John Wiley & Sons. Nueva York,

Shapiro S.S. & Wilk M.B (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). Biometrika 52: 591-611.

Williams, D.A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, 103-117.

Williams, D.A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, 519 531.

▼M6

*Apéndice 1*

**Definiciones**

A efectos del presente método de ensayo, se aplicarán las siguientes definiciones:

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

El **período de acondicionamiento** se utiliza para estabilizar el componente microbiano del sedimento y eliminar, por ejemplo, el amoníaco procedente de los componentes del sedimento; tiene lugar antes del enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema. Por lo general, el agua sobrenadante se descarta tras el acondicionamiento.

**$EC_x$**: concentración de la sustancia problema en el sedimento que da lugar a un efecto del X % (por ejemplo, del 50 %) en un parámetro biológico dentro del período de exposición establecido.

El **período de equilibrado** se utiliza para permitir la distribución de la sustancia problema entre la fase sólida, el agua intersticial y el agua sobrenadante; tiene lugar tras el enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema y antes de que se añadan los organismos de ensayo.

**Fase de exposición**: tiempo durante el cual los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema.

**Sedimento artificial** (o sedimento reconstituido, formulado o sintético): mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: concentración más baja de sustancia problema que se ha empleado en el ensayo con la que se observa un efecto tóxico significativo (a $p \leq 0,05$) en comparación con el control. Sin embargo, es necesario también que todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC ejerzan un efecto superior o igual al que se observa con dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el control, no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) dentro del período de exposición establecido.

**Coeficiente de reparto octanol/agua** ($K_{ow}$; expresado a veces como $P_{ow}$): es la relación entre la solubilidad de una sustancia en n-octanol y en agua, en equilibrio, y representa la lipofilia de la sustancia (capítulo A.24 del presente anexo). Se utiliza $K_{ow}$ (o su logaritmo, log $K_{ow}$) como indicación del potencial de bioacumulación de una sustancia por los organismos acuáticos.

**Coeficiente de reparto carbono orgánico-agua** ($K_{oc}$): relación de la concentración de una sustancia en la fracción de carbono orgánico de un sedimento respecto a su concentración en el agua, en equilibrio.

**Agua sobrenadante**: agua que cubre el sedimento en el recipiente de ensayo.

**Agua intersticial**: agua que ocupa el espacio entre las partículas de sedimento o de suelo.

**Sedimento enriquecido**: sedimento al que se ha añadido sustancia problema.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼**M6**

*Apéndice 2*

**Composición del agua reconstituida recomendada**

[tomada del capítulo C.1 del presente anexo (1)]

a) *Solución de cloruro de calcio*

Se disuelven 11,76 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ en agua desionizada; se enrasa a 1 l con agua desionizada.

b) *Solución de sulfato de magnesio*

Se disuelven 4,93 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ en agua desionizada; se enrasa a 1 l con agua desionizada.

c) *Solución de bicarbonato de sodio*

Se disuelven 2,59 g $NaHCO_3$ en agua desionizada; se enrasa a 1 l con agua desionizada.

d) *Solución de cloruro de potasio*

Se disuelven 0,23 g KCl en agua desionizada; se enrasa a 1 l con agua desionizada.

Los productos químicos deben ser de calidad analítica.

La conductividad del agua destilada o desionizada no debe ser mayor de 10 $\mu Scm^{-1}$.

Se mezclan 25 ml de cada una de las soluciones a) a d) y el volumen total se lleva a 1 l con agua desionizada. La suma de los iones de calcio y de magnesio en estas soluciones es igual a 2,5 mmol/l.

La relación de los iones Ca:Mg es de 4:1 y la de los iones Na:K, de 10:1. La alcalinidad o capacidad de ácido $K_{S4.3}$ de esta solución es de 0,8 mmol/l.

Se airea el agua de dilución hasta que se alcance la saturación de oxígeno y, a continuación, se conserva durante unos dos días sin más aireación antes de su utilización.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Capítulo C.1 del presente anexo: Toxicidad aguda en peces.

▼**M6**

*Apéndice 3*

**CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ACEPTABLE**

| Componente | Concentraciones |
|---|---|
| Partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 µg/l |
| Amoníaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |
| [adoptada de OCDE (1992) (1)] | |

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (1992). Guidelines for Testing of Chemicals No. 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OCDE, París.

▼M6

*Apéndice 4*

**Sedimento artificial recomendado: orientaciones sobre la preparación y el almacenamiento**

**Componentes del sedimento**

| Componente | Características | Porcentaje de peso seco de sedimento |
|---|---|---|
| Turba | Turba esfágnea, grado de descomposición: «medio», secada al aire, sin restos vegetales visibles, finamente molida (tamaño de partícula ≤ 0,5 mm) | 5 ± 0,5 |
| Arena de cuarzo | Granulometría: ≤ 2 mm, pero > 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50 - 200 μm | 75 - 76 |
| Caolín | Contenido en caolinita ≥ 30 % | 20 ± 1 |
| Fuente de alimento | Por ejemplo, polvo de Urtica (Folia Urticae), hoja de Urtica dioica (ortiga), finamente molida (tamaño de partícula ≤ 0,5 mm); de conformidad con normas farmacéuticas, para consumo humano; además del sedimento seco | 0,4 - 0,5 %) |
| Carbono orgánico | Ajustado mediante adición de turba y arena | 2 ± 0,5 |
| Carbonato de calcio | $CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro, además del sedimento seco | 0,05 - 1 |
| Agua desionizada | Conductividad ≤ 10 μS/cm, además del sedimento seco | 30 - 50 |

*Nota:* Si se esperan elevadas concentraciones de amoníaco, por ejemplo si se sabe que la sustancia problema inhibe la nitrificación, puede ser útil sustituir un 50 % del polvo de ortiga, rico en nitrógeno, por celulosa [por ejemplo, α-celulosa en polvo, químicamente pura, tamaño de partícula ≤ 0,5 mm; (1, 2)].

**Preparación**

La turba se seca al aire y se tritura hasta convertirse en un polvo fino. Se prepara en agua desionizada una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba, utilizando un dispositivo de homogeneización de prestaciones elevadas. El pH de esta suspensión se ajusta a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. La suspensión se deja durante al menos dos días con agitación suave a 20 ± 2 °C, para estabilizar el pH e implantar un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH, que debe estar a 6,0 ± 0,5. A continuación se mezcla la suspensión de turba con los demás componentes (arena y caolín) y con agua desionizada para obtener un sedimento homogéneo con un contenido de agua del 30–50 % del peso seco del sedimento. Se vuelve a medir el pH de la mezcla final y se ajusta a 6,5-7,5 con $CaCO_3$ en caso necesario. No obstante, si se espera que se produzca amoníaco, puede ser útil mantener el pH del sedimento por debajo de 7,0 (por ejemplo, entre 6,0 y 6,5). Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido de carbono orgánico. Si se espera que se produzca amoníaco, el sedimento artificial puede dejarse durante siete días en las mismas condiciones que vayan a darse posteriormente en el ensayo (por ejemplo, relación sedimento-agua de 1:4, altura de la capa de sedimento como en los recipientes de ensayo) antes de enriquecerse con la sustancia problema, es decir, debe cubrirse con agua, que ha de airearse. Al final de este período de acondicionamiento, el agua sobrenadante debe retirarse y eliminarse. A continuación, la arena de cuarzo enriquecida

▼M6

con la sustancia problema se mezcla con el sedimento para cada nivel de tratamiento, el sedimento se reparte en los recipientes de ensayo replicados, y se cubre con el agua de ensayo. Los recipientes se incuban a continuación en las mismas condiciones que vayan a darse posteriormente en el ensayo. Entonces es cuando comienza el período de equilibrado. El agua sobrenadante debe airearse.

La fuente elegida de alimento debe añadirse antes del enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema, o durante el mismo. Puede mezclarse con la suspensión de turba al principio (véase más arriba). No obstante, puede evitarse la degradación excesiva de la fuente de alimento antes de añadir los organismos de ensayo —por ejemplo, en caso de que sea largo el período de equilibrado— reduciendo al mínimo el tiempo transcurrido entre la adición de alimento y el inicio de la exposición. Con el fin de garantizar que el alimento está añadido con la sustancia problema, la fuente de alimento debe mezclarse con el sedimento como muy tarde el día en que la sustancia problema se introduce en el sedimento.

**Almacenamiento**

Los componentes secos del sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, o a temperatura ambiente. El sedimento preparado enriquecido con la sustancia problema debe utilizarse en el ensayo inmediatamente. Hasta el momento de su análisis, es posible conservar, en las condiciones recomendadas para las sustancia problema concreta, muestras del sedimento enriquecido.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. En cooperación con R. Nagel y B. Karaoglan. Informe para la Agencia Medioambiental Federal de Alemania (Umweltbundesamt Berlin), R & D No.: 202 67 429.

(2) Liebig M., Meller M. & Egeler P. (2004). Sedimenttoxizitätstests mit aquatischen Oligochaeten — Einfluss verschiedener Futterquellen im künstlichen Sediment auf Reproduktion und Biomasse von *Lumbriculus variegatus*. Proceedings 5/2004: Statusseminar Sedimentkontakttests. March 24-25, 2004. BfG (Bundesanstalt für Gewässerkunde), Coblenza, Alemania, pp. 107-119.

▼M6

*Apéndice 5*

**Métodos de cultivo de *Lumbriculus variegatus***

El organismo *Lumbriculus variegatus* (Müller), Lumbriculidae, Oligochaeta, es un habitante de los sedimentos de agua dulce, y se utiliza ampliamente en ensayos ecotoxicológicos. Puede cultivarse fácilmente en condiciones de laboratorio. A continuación se recoge una descripción general de los métodos de cultivo.

**Métodos de cultivo**

Las condiciones de cultivo de *Lumbriculus variegatus* se detallan en Phipps *et al.* (1993) (1), Brunson *et al.* (1998) (2), ASTM (2000) (3), y U.S. EPA (2000) (4). Un breve resumen de estas condiciones figura a continuación. Una importante ventaja de *L. variegatus* es su rápida reproducción, lo que se traduce en el veloz aumento de la biomasa de las poblaciones cultivadas en laboratorio [por ejemplo, (1), (3), (4), (5)].

Los gusanos pueden someterse a cultivo en acuarios grandes (57-80 l) a 23 °C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (100-1 000 lx) utilizando agua natural renovada diariamente (45-50 l por acuario). El sustrato se prepara cortando en tiras servilletas de papel marrón sin blanquear, que pueden mezclarse a continuación con agua de cultivo durante unos segundos, para dar lugar a pequeños fragmentos de sustrato de papel. Este sustrato puede entonces utilizarse directamente en los acuarios de cultivo de *Lumbriculus*, cubriendo la superficie del fondo del tanque, o conservarse congelado en agua desionizada para su uso posterior. Un sustrato nuevo puesto en el tanque suele durar aproximadamente dos meses.

Cada cultivo de gusanos comienza con 500-1 000 gusanos y se alimenta 3 veces por semana con 10 ml de suspensión que contienen 6 g de comida para cultivo inicial de truchas, en condiciones dinámicas o de renovación. Los cultivos estáticos o semiestáticos deben recibir alimentos a una dosis inferior para evitar el crecimiento de hongos y bacterias.

En estas condiciones, el número de individuos presentes en el cultivo se duplica, por lo general, cada 10 o 14 días.

Otra posibilidad consiste en cultivar *Lumbriculus variegatus* en un sistema consistente en una capa de arena de cuarzo utilizada para el sedimento artificial (1-2 cm de profundidad) y agua reconstituida. Pueden utilizarse para el cultivo recipientes de vidrio o de acero inoxidable con una altura de 12 a 20 cm. El agua debe airearse suavemente (por ejemplo, 2 burbujas por segundo) mediante una pipeta Pasteur situada a unos 2 cm por encima de la superficie del sedimento. Para evitar la acumulación de, p. ej., amoníaco, el agua sobrenadante debe cambiarse utilizando un sistema dinámico, o bien de forma manual, al menos una vez por semana. Los oligoquetos pueden mantenerse a temperatura ambiente con un fotoperíodo de 16 horas de luz (de intensidad de 100 a 1 000 lx) y 8 horas de oscuridad. En el cultivo semiestático (renovación del agua una vez por semana), los gusanos se alimentan dos veces por semana con TetraMin (p. ej., de 0,6 a 0,8 mg por $cm^2$ de superficie del sedimento), que puede aplicarse en forma de suspensión de 50 mg de TetraMin por ml de agua desionizada.

Pueden retirarse de los cultivos los ejemplares de *Lumbriculus variegatus*, por ejemplo transfiriendo sustrato con una red de malla fina a otro vaso de precipitados, o tomando solo los organismos con una pipeta de vidrio de boca ancha pulida al fuego (de unos 5 mm de diámetro). Si a ese otro vaso de precipitados se transfiere a la vez sustrato, el vaso de precipitados que contenga sustrato y gusanos se deja una noche en condiciones dinámicas, con lo que se eliminará el sustrato del vaso, mientras que los gusanos se mantendrán en el fondo del recipiente. Estos pueden introducirse en tanques de cultivo recién preparados, o seguir el procedimiento para el ensayo, tal como se indica en las referencias (3) y (4), o a continuación.

Una cuestión que debe considerarse de forma crítica si se utiliza *L. variegatus* en pruebas con sedimentos es su modo de reproducción [arquitomía o morfalaxis (véase, p. ej., (6)]. Esta reproducción asexual resulta en dos fragmentos, que no se alimentan durante un determinado período de tiempo, hasta que se regenera la cabeza o la cola [por ejemplo, (7), (8)]. Esto significa que en *L. variegatus* la exposición por ingestión de sedimento contaminado no tiene lugar de forma continua.

▼M6

Por lo tanto, debe realizarse una sincronización para reducir al mínimo la reproducción y regeneración incontroladas, y la gran variación consiguiente en los resultados de los ensayos. Tal variación puede producirse en los casos en los que determinados individuos, que se han fragmentado y, por lo tanto, no se alimentan durante un cierto tiempo, están menos expuestos a la sustancia problema que otros individuos, que no se fragmentan durante el ensayo (9), (10), (11). Entre 10 y 14 días antes de la fecha de inicio de la exposición, los gusanos deben fragmentarse artificialmente (sincronización). Para esta sincronización deben seleccionarse gusanos grandes (adultos), que de preferencia no muestren signos de morfalaxis reciente. Estos gusanos pueden colocarse en un portaobjetos de vidrio con una gota de agua de cultivo, y diseccionarse por la región mediana del cuerpo con un bisturí. Debe velarse por que los extremos posteriores sean de tamaño similar. Debe dejarse entonces que los extremos posteriores regeneren nuevas cabezas en un recipiente de cultivo que contenga el mismo sustrato utilizado en el cultivo y agua reconstituida, hasta el inicio de la exposición. La regeneración de cabezas nuevas queda de manifiesto cuando los gusanos sincronizados se entierran en el sustrato (la presencia de cabezas regeneradas podrá confirmarse mediante la inspección de una submuestra representativa con un microscopio binocular). Se prevé que los organismos de ensayo se encontrarán después en un estado fisiológico similar. Esto significa que, cuando se produzca durante el ensayo la reproducción por morfalaxis en gusanos sincronizados, se espera que prácticamente todos los animales queden expuestos de la misma forma al sedimento enriquecido. Debe darse alimento a los gusanos sincronizados tan pronto como estos empiecen a enterrarse en el sustrato, o 7 días después de la disección. El régimen de alimentación debe ser comparable al de los cultivos normales, aunque podría ser recomendable alimentar los gusanos sincronizados con la misma fuente de alimento que se vaya a utilizar en el ensayo. Los gusanos deben mantenerse a la temperatura de ensayo, a 20 ± 2 °C. Después de la regeneración deben utilizarse para el ensayo gusanos completos intactos, que naden o se arrastren activamente tras un suave estímulo mecánico. Deben evitarse las lesiones o la autotomía de los gusanos, por ejemplo manipulándolos con pipetas de bordes pulidos al fuego, o palillos dentales de acero inoxidable.

**Fuentes de cultivos iniciales de *Lumbriculus variegatus* [direcciones de los EE.UU. tomadas de (4)]**

**Europa**

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstr. 2-14
D-65439 Flörsheim/Main
Alemania

Bayer Crop Science AG
Development — Ecotoxicology
Alfred-Nobel-Str. 50
D-40789 Monheim
Alemania

University of Joensuu
Laboratory of Aquatic Toxicology
Dept. of Biology
Yliopistokatu 7, P.O. Box 111
FIN-80101 Joensuu
Finlandia

Dresden University of Technology
Institut für Hydrobiologie
Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften
Mommsenstr. 13
D-01062 Dresde
Alemania

C.N.R.- I.R.S.A.
Italian National Research Council
Water Research Institute
Via Mornera 25
I-20047 Brugherio MI

**EE.UU.**

U.S. Environmental Protection Agency
Mid-Continent Ecological Division
6201 Congdon Boulevard
Duluth, MN 55804

Michigan State University
Department of Fisheries and Wildlife
No. 13 Natural Resources Building
East Lansing, MI 48824-1222

▼**M6**

U.S. Environmental Protection Agency
Environmental Monitoring System Laboratory
26 W. Martin Luther Dr.
Cincinnati, OH 45244

Wright State University
Institute for Environmental Quality
Dayton, OH 45435

Columbia Environmental Research Center
U.S. Geological Survey
4200 New Haven Road
Columbia, MO 65201

Great Lakes Environmental Research Laboratory, NOAA
2205 Commonwealth Boulevard
Ann Arbor, MI 48105-1593

BIBLIOGRAFÍA

(1) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, 269-279.

(2) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. & Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed *Lumbriculus variegatus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 191-201.

(3) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. En: ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(4) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition. EPA 600/R-99/064, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.

(5) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, 1457-1468.

(6) Drewes C.D. & Fourtner C.R. (1990). Morphallaxis in an aquatic oligochaete, *Lumbriculus variegatus*: Reorganisation of escape reflexes in regenerating body fragments. Develop. Biol. 138: 94-103.

(7) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998a). Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of *Lumbriculus variegatus* (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: 2196-2202.

(8) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. (1998b). Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Müller). Hydrobiologia 377: 183-194.

(9) Brust, K., O. Licht, V. Hultsch, D. Jungmann & R. Nagel (2001). Effects of Terbutryn on Aufwuchs and *Lumbriculus variegatus* in Artificial Indoor Streams. Environ. Toxicol. Chemistry, Vol. 20, pp. 2000–2007.

(10) Oetken, M., K.-U. Ludwichowski & R. Nagel (2000). Sediment tests with *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius* and 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA) within the scope of EG-AltstoffV. By order of the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), FKZ 360 12 001, March 2000.

(11) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbriculus variegatus*, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, 1503-1508.

▼M6

*Apéndice 6*

**Resumen de los resultados del ensayo interlaboratorios**

**«Ensayo de toxicidad del sedimento con *Lumbriculus variegatus*»**

*Cuadro 1.*

**Resultado de los distintos ciclos del ensayo interlaboratorios: número medio de los gusanos de los controles y de los controles de disolvente al final del ensayo; SD = desviación típica; CV = coeficiente de variación.**

| | Número medio de gusanos en los controles | SD | CV (%) | n | Número medio de gusanos en los controles de disolvente | SD | CV (%) | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **32,3** | 7,37 | 22,80 | 3 | **39,0** | 3,61 | 9,25 | 3 |
| | **40,8** | 6,55 | 16,05 | 6 | **36,0** | 5,29 | 14,70 | 3 |
| | **41,5** | 3,54 | 8,52 | 2 | **38,5** | 7,05 | 18,31 | 4 |
| | **16,3** | 5,99 | 36,67 | 6 | **30,8** | 6,70 | 21,80 | 4 |
| | **24,3** | 10,69 | 43,94 | 3 | **26,3** | 3,06 | 11,60 | 3 |
| | **28,5** | 8,29 | 29,08 | 4 | **30,7** | 1,15 | 3,77 | 3 |
| | **28,3** | 3,72 | 13,14 | 6 | **28,8** | 2,56 | 8,89 | 6 |
| | **25,3** | 5,51 | 21,74 | 3 | **27,7** | 1,53 | 5,52 | 3 |
| | **23,8** | 2,99 | 12,57 | 4 | **21,3** | 1,71 | 8,04 | 4 |
| | **36,8** | 8,80 | 23,88 | 6 | **35,0** | 4,20 | 11,99 | 6 |
| | **33,0** | 3,58 | 10,84 | 6 | **33,5** | 1,73 | 5,17 | 4 |
| | **20,7** | 2,73 | 13,22 | 6 | **15,0** | 6,68 | 44,56 | 4 |
| | **42,0** | 7,07 | 16,84 | 6 | **43,7** | 0,58 | 1,32 | 3 |
| | **18,2** | 3,60 | 19,82 | 6 | **21,7** | 4,04 | 18,65 | 3 |
| | **32,0** | 3,95 | 12,34 | 6 | **31,3** | 4,79 | 15,32 | 4 |
| **Media interlaboratorios** | **29,59** | | **20,10** | | **30,61** | | **13,26** | |
| **SD** | **8,32** | | **10,03** | | **7,57** | | **10,48** | |
| **n** | **15** | | | | **15** | | | |
| **mín** | **16,3** | | | | **15,0** | | | |
| **máx** | **42,0** | | | | **43,7** | | | |
| **CV (%)** | **28,1** | | | | **24,7** | | | |

▼M6

*Cuadro 2.*

**Resultado de los distintos ciclos del ensayo interlaboratorios: peso seco total medio de los gusanos por réplica de los controles y de los controles de disolvente al final del ensayo; SD = desviación típica; CV = coeficiente de variación.**

| | Peso seco total de los gusanos por réplica (controles) | SD | CV (%) | n | Peso seco total de los gusanos por réplica (controles de disolvente) | SD | CV (%) | n |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **24,72** | 6,31 | 25,51 | 3 | 27,35 | 4,08 | 14,93 | 3 |
| | **30,17** | 2,04 | 6,75 | 6 | 33,83 | 10,40 | 30,73 | 3 |
| | **23,65** | 3,61 | 15,25 | 2 | 28,78 | 4,68 | 16,28 | 4 |
| | **12,92** | 6,83 | 52,91 | 6 | 24,90 | 6,84 | 27,47 | 4 |
| | **21,31** | 4,17 | 19,57 | 3 | 25,87 | 5,30 | 20,49 | 3 |
| | **22,99** | 4,86 | 21,16 | 4 | 24,64 | 5,09 | 20,67 | 3 |
| | **18,91** | 1,91 | 10,09 | 6 | 19,89 | 1,77 | 8,89 | 6 |
| | **24,13** | 1,63 | 6,75 | 3 | 25,83 | 2,17 | 8,41 | 3 |
| | **22,15** | 3,18 | 14,34 | 4 | 22,80 | 2,60 | 11,40 | 4 |
| | **35,20** | 8,12 | 23,07 | 6 | 31,42 | 8,45 | 26,90 | 6 |
| | **41,28** | 5,79 | 14,02 | 6 | 41,42 | 4,37 | 10,55 | 4 |
| | **15,17** | 5,78 | 38,09 | 6 | 10,50 | 3,42 | 32,53 | 4 |
| | **35,69** | 8,55 | 23,94 | 6 | 38,22 | 1,23 | 3,21 | 3 |
| | **19,57** | 5,21 | 26,65 | 6 | 28,58 | 6,23 | 21,81 | 3 |
| | **29,40** | 2,16 | 7,34 | 6 | 31,15 | 2,70 | 8,67 | 4 |
| **Media interlaboratorios** | **25,15** | | **20,36** | | **27,68** | | **17,53** | |
| **SD** | **7,87** | | **12,56** | | **7,41** | | **9,10** | |
| **n** | **15** | | | | **15** | | | |
| **mín.** | **12,9** | | | | **10,5** | | | |
| **máx.** | **41,3** | | | | **41,4** | | | |
| **CV (%)** | **31,3** | | | | **26,8** | | | |

▼M6

*Cuadro 3.*

**Toxicidad del PCP: Resumen de los parámetros de la prueba interlaboratorios; medias interlaboratorios de $EC_{50}$, NOEC y LOEC; SD = desviación típica; CV = coeficiente de variación.**

| Parámetro biológico | | Media interlaboratorios (mg/kg) | mín | máx | Factor interlaboratorios | SD | CV (%) | Media geométr. (mg/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Número total de gusanos** | **$EC_{50}$** | **23,0** | 4,0 | 37,9 | 9,4 | 10,7 | 46,3 | 19,9 |
| | **NOEC** | **9,9** | 2,1 | 22,7 | 10,7 | 7,2 | 72,3 | 7,6 |
| | **LOEC** | **27,9** | 4,7 | 66,7 | 14,2 | 19,4 | 69,4 | 20,9 |
| | **DDM (%)** | **22,5** | 7,1 | 39,1 | | | | |
| **Peso seco total de los gusanos** | **$EC_{50}$** | **20,4** | 7,3 | 39,9 | 5,5 | 9,1 | 44,5 | 18,2 |
| | **NOEC** | **9,3** | 2,1 | 20,0 | 9,4 | 6,6 | 70,4 | 7,4 |
| | **LOEC** | **25,7** | 2,1 | 50,0 | 23,5 | 16,8 | 65,5 | 19,4 |
| | **DDM (%)** | **24,8** | 10,9 | 44,7 | | | | |
| **Mortalidad/ supervivencia** | **$LC_{50}$** | **25,3** | 6,5 | 37,2 | 5,7 | 9,4 | 37,4 | 23,1 |
| | **NOEC** | **16,5** | 2,1 | 40,0 | 18,8 | 10,3 | 62,4 | 12,8 |
| | **LOEC** | **39,1** | 4,7 | 66,7 | 14,2 | 18,1 | 46,2 | 32,6 |
| **Reproducción (aumento del número de gusanos por réplica)** | **$EC_{50}$** | **20,0** | 6,7 | 28,9 | 4,3 | 7,6 | 37,9 | 18,3 |
| | **NOEC** | **7,9** | 2,1 | 20,0 | 9,4 | 5,2 | 66,0 | 6,4 |
| | **LOEC** | **22,5** | 2,1 | 50,0 | 23,5 | 15,4 | 68,6 | 16,0 |
| | **DDM (%)** | **29,7** | 13,9 | 47,9 | | | | |
| **Crecimiento (aumento de biomasa por réplica)** | **$EC_{50}$** | **15,3** | 5,7 | 29,9 | 5,2 | 7,1 | 46,5 | 13,7 |
| | **NOEC** | **8,7** | 2,1 | 20,0 | 9,4 | 6,0 | 68,1 | 6,9 |
| | **LOEC** | **24,0** | 2,1 | 50,0 | 23,5 | 15,7 | 65,5 | 17,3 |
| | **DDM (%)** | **32,2** | 13,6 | 65,2 | | | | |

DDM: diferencia detectable mínima respecto a los valores de control durante los contrastes de hipótesis; se utiliza como medida de la potencia estadística.

BIBLIOGRAFÍA

Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* by an international ring test. En cooperación con R. Nagel y B. Karaoglan. Informe para la Agencia Medioambiental Federal de Alemania (Umweltbundesamt Berlin), R & D No.: 202 67 429.

▼M6

## C.36. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN DE UN ÁCARO PREDADOR [*HYPOASPIS (GEOLAELAPS) ACULEIFER*] EN EL SUELO

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 226 (2008). El presente método de ensayo está diseñado para evaluar los efectos de las sustancias del suelo sobre el resultado reproductor de la especie de ácaro del suelo *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae), permitiendo así la estimación de la inhibición de la tasa específica de crecimiento de la población (1), (2). Por resultado reproductor se entiende aquí el número de juveniles al final del período de ensayo. *H. aculeifer* representa un nivel trófico adicional al de las especies para las que ya se dispone de métodos de ensayo. Para los fines del presente método de ensayo se considera adecuado un ensayo de reproducción sin discriminación ni cuantificación de las diferentes fases del ciclo reproductivo. Para las sustancias con una situación de exposición distinta de la exposición a través del suelo, podrían ser apropiados otros enfoques (3).

2. Se considera que *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* es un representante pertinente de la fauna del suelo y de los ácaros predadores en particular. Presenta una distribución universal (5) y puede recogerse y criarse en el laboratorio fácilmente. En el apéndice 7 se recoge un resumen sobre la biología de *H. aculeifer*. Se dispone de datos previos sobre la ecología de esta especie de ácaros y sobre su utilización en ensayos ecotoxicológicos (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12).

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

3. Se exponen hembras adultas a un intervalo de concentraciones de la sustancia problema mezclada con un suelo artificial. El ensayo se inicia con 10 hembras adultas por réplica (recipiente). En el ensayo no se introducen machos, ya que la experiencia ha demostrado que las hembras se aparean inmediatamente o poco después de salir de la fase de deutoninfa, si hay machos presentes. Además, la inclusión de los machos prolongaría el ensayo de manera que se haría necesaria una laboriosa discriminación de las fases de desarrollo. Así pues, el apareamiento en sí no forma parte del ensayo. Las hembras se introducen en el ensayo a los 28-35 días del inicio del período de puesta de huevos en el proceso de sincronización (véase el apéndice 4), ya que entonces puede considerarse que las hembras se han apareado y han superado la fase de preoviposición. A 20 °C, el ensayo termina el día 14 después de la introducción de las hembras (día 0), lo que permite que los primeros descendientes de los controles alcancen la fase de deutoninfa (véase el apéndice 4). Para obtener la variable principal medida, se determina el número de juveniles por recipiente de ensayo y, además, el número de hembras supervivientes. El resultado reproductor de los ácaros expuestos a la sustancia problema se compara con el de los controles para determinar la $EC_x$ (por ejemplo, $EC_{10}$, $EC_{50}$) o la concentración sin efecto observado (NOEC) (véanse las definiciones en el apéndice 1), dependiendo del diseño experimental (véase el punto 29). En el apéndice 8 figura un resumen del programa de ensayo.

### INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

4. Es preferible conocer la hidrosolubilidad, el log $K_{ow}$, el coeficiente de reparto agua/suelo y la presión de vapor de la sustancia problema. Es conveniente disponer de información adicional sobre el destino de la sustancia problema en el suelo, tal como las velocidades de degradación biótica y abiótica.

5. Este método de ensayo puede utilizarse para sustancias tanto solubles como insolubles en agua. Sin embargo, el modo de aplicación de la sustancia problema variará en consecuencia. El método de ensayo no es aplicable a las sustancias volátiles, es decir, sustancias cuya constante de Henry o cuyo coeficiente de reparto aire/agua sea superior a uno, o sustancias cuya presión de vapor a 25 °C supere los 0,0133 Pa.

▼M6

VALIDEZ DEL ENSAYO

6. Para que el resultado de un ensayo se considere válido, deben cumplirse los siguientes criterios en lo tocante a los controles sin tratar:

— La mortalidad media de las hembras adultas no debe ser superior al 20 % al final del ensayo;

— El número medio de juveniles por réplica (con 10 hembras adultas introducidas) debe ser como mínimo de 50 al final del ensayo;

— El coeficiente de variación calculado para el número de ácaros juveniles por réplica no debe ser superior al 30 % al final del ensayo definitivo.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

7. Debe determinarse la $EC_x$ y/o la NOEC de una sustancia de referencia para tener garantías de que las condiciones de ensayo del laboratorio son adecuadas y para verificar que la respuesta de los organismos de ensayo no cambia a lo largo del tiempo. El dimetoato (nº CAS 60-51-5) es una sustancia de referencia apropiada que ha mostrado que afecta al tamaño de la población (4). El ácido bórico (nº CAS 10043-35-3) puede utilizarse como sustancia de referencia alternativa. Con esta sustancia se tiene menos experiencia. Son posibles dos opciones de diseño:

— La sustancia de referencia puede someterse a ensayo en paralelo a la determinación de la toxicidad de cada sustancia problema a una sola concentración, de la que se debe haber demostrado previamente, en un estudio de la relación dosis-respuesta, que provoca un efecto de reducción > 50 % de la descendencia. En este caso, el número de réplicas debe ser el mismo que en los controles (véase el punto 29).

— Como alternativa, la sustancia de referencia se puede someter 1-2 veces al año a un ensayo de determinación de la relación dosis-respuesta. En función del diseño elegido, varían el número de concentraciones y réplicas y el factor de separación (véase el punto 29), pero debería lograrse una respuesta con un efecto de entre el 10 y el 90 % (factor de espaciado de 1,8). La $EC_{50}$ del dimetoato basada en el número de juveniles debe oscilar entre 3,0 y 7,0 mg de sustancia activa /kg de suelo (peso seco). Sobre la base de los resultados obtenidos con ácido bórico hasta ahora, la $EC_{50}$ basada en el número de juveniles debe estar en el intervalo comprendido entre 100 y 500 mg/kg de suelo (peso seco).

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

**Recipientes y equipo del ensayo**

8. Deben usarse recipientes de ensayo de 3 a 5 cm de diámetro (altura del suelo ≥ 1,5 cm), de vidrio u otro material químicamente inerte y que tengan una tapa que ajuste bien. Se prefieren las tapas de rosca y, en ese caso, los recipientes podrían airearse dos veces por semana. Otra posibilidad consiste en utilizar tapas que permitan el intercambio gaseoso directo entre el sustrato y la atmósfera (por ejemplo, de gasa). Dado que el contenido de humedad debe mantenerse suficientemente alto durante el ensayo, es esencial controlar el peso de cada recipiente experimental durante el ensayo y añadir agua en caso necesario. Esto puede ser especialmente importante en caso de que no se disponga de tapas de rosca. Si se utiliza un recipiente de ensayo no transparente, la tapa debe estar hecha de un material que permita la entrada de luz (por ejemplo, una tapa transparente perforada) y que evite al mismo tiempo que se escapen los ácaros. El tamaño y el tipo de recipiente de ensayo dependen del método de extracción (véanse más detalles en el anexo 5). En el caso de que se aplique directamente al recipiente de ensayo la extracción por calor, puede añadirse un tamiz de fondo de luz de malla adecuada (sellada hasta la extracción), y la profundidad del suelo debe ser suficiente para permitir un gradiente de temperatura y de humedad.

▼M6

9. Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

— recipientes, preferentemente de vidrio, con tapa de rosca;

— estufa secadora;

— microscopio estereoscópico;

— pinceles para transferir los ácaros;

— pH-metro y luxómetro;

— balanzas de precisión adecuada;

— equipo adecuado para el control de la temperatura;

— equipo adecuado para el control de la humedad del aire (no esencial si los recipientes de exposición tienen tapa);

— incubadora o pequeña sala de temperatura controlada;

— equipos de extracción (véase el apéndice 5) (13);

— panel luminoso superior, con control de la luz;

— tarros de recogida para los ácaros extraídos.

**Preparación del suelo artificial**

10. Para este ensayo se utiliza suelo artificial. Este consta de los componentes siguientes (todos los valores en peso seco):

— 5 % de turba esfágnea, secada al aire y finamente molida (es aceptable un tamaño de partícula de 2 ± 1 mm);

— 20 % de caolín, con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

— alrededor del 74 % de arena industrial secada al aire (dependiendo de la cantidad necesaria de $CaCO_3$), en su mayor parte en forma de arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm. La cantidad exacta de arena depende de la cantidad de $CaCO_3$ (véase más abajo), juntas deben constituir el 75 %.

— < 1,0 % de carbonato de calcio ($CaCO_3$, pulverizado, de pureza analítica) para obtener un pH de 6,0 ± 0,5; la cantidad de carbonato de calcio añadido puede depender principalmente de la calidad o naturaleza de la turba (véase la nota 1).

*Nota 1:* La cantidad necesaria de $CaCO_3$ depende de los componentes del sustrato del suelo y debe determinarse midiendo el pH de submuestras del suelo inmediatamente antes de ensayo (14).

*Nota 2:* El contenido de turba del suelo artificial se aparta del de otros métodos de ensayo con organismos del suelo, en la mayoría de los cuales se utiliza un 10 % de turba [véase, p. ej., (15)]. Sin embargo, con arreglo a la OEPP (16), un suelo agrícola típico no tiene más de un 5 % de materia orgánica, y la reducción del contenido de turba refleja, pues, la disminución de las posibilidades de sorción de la sustancia problema al carbono orgánico en un suelo natural.

*Nota 3:* En caso necesario, por ejemplo con fines de ensayo específicos, pueden también servir como sustrato de ensayo o cultivo suelos naturales procedentes de lugares exentos de contaminación. No obstante, si se utiliza suelo natural, este debe caracterizarse al menos por su origen (lugar de recogida), pH, textura (granulometría) y contenido de materia orgánica. Si se dispone de ellos, deben incluirse el tipo y el nombre del suelo con arreglo a la clasificación del suelo, y el suelo ha de estar libre de toda contaminación. En caso de que la sustancia problema sea un metal o un compuesto

▼M6

organo-metálico, debe determinarse también la capacidad de intercambio catiónico (CEC) del suelo natural. Debe prestarse especial atención al cumplimiento de los criterios de validez, ya que no es frecuente disponer de información de base sobre los suelos naturales.

11. Los componentes secos del suelo se mezclan a fondo (por ejemplo, en un mezclador de laboratorio de gran escala). Para la determinación del pH se utiliza una mezcla de suelo y solución de cloruro de potasio (KCl) 1 M o de cloruro de calcio ($CaCl_2$) 0,01 M en una proporción de 1:5 [véanse la referencia (14) y el apéndice 3]. Si el suelo es más ácido que la banda exigida (véase el punto 10), puede ajustarse añadiendo una cantidad adecuada de $CaCO_3$. Si el suelo es demasiado alcalino, puede ajustarse mediante la adición de más cantidad de la mezcla que incluye los tres primeros componentes descritos en el punto 10, pero excluyendo el $CaCO_3$.

12. La capacidad máxima de retención de agua del suelo artificial se determina de acuerdo con los procedimientos descritos en el apéndice 2. Entre dos y siete días antes del inicio del ensayo, el suelo artificial seco se prehumedece, añadiéndole una cantidad suficiente de agua destilada o desionizada para obtener aproximadamente la mitad del contenido final de agua, que supone de un 40 a un 60 % de la capacidad máxima de retención de agua. El contenido de humedad se ajusta al 40-60 % de la capacidad máxima de retención de agua mediante la adición de la solución de la sustancia problema y/o añadiendo agua desionizada o destilada (véanse los puntos 16 a 18). Debe obtenerse una estimación general adicional del contenido de humedad del suelo apretando este suavemente con la mano; si el contenido de humedad es correcto, deben aparecer gotitas de agua entre los dedos.

13. Se determina el contenido de humedad del suelo al inicio y al final del ensayo, secándolo hasta peso constante a 105 °C, de conformidad con la norma ISO 11465 (17), y el pH del suelo de conformidad con el apéndice 3, o la norma ISO 10390 (14). Estas mediciones deben realizarse con muestras adicionales sin ácaros, tanto del suelo de los controles como del suelo de cada concentración de ensayo. El pH del suelo no debe ajustarse cuando se ensayen sustancias ácidas o básicas. El contenido de humedad debe comprobarse a lo largo de todo el ensayo pesando los recipientes de manera periódica (véanse los puntos 20 y 24).

**Selección y preparación de los animales de ensayo**

14. La especie usada en el ensayo es *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* (Canestrini, 1883). Para iniciar el ensayo se requieren ácaros hembras adultos, obtenidos a partir de una cohorte sincronizada. Los ácaros deben introducirse a los 7-14 días después de haberse convertido en adultos, a los 28-35 días desde el inicio de la puesta de huevos en la sincronización (véanse el punto 3 y el apéndice 4). Debe indicarse la fuente de los ácaros o el proveedor, así como el mantenimiento del cultivo de laboratorio. Si se mantiene un cultivo de laboratorio, se recomienda confirmar la identidad de la especie al menos una vez al año. En el apéndice 6 se incluye una ficha de identificación.

**Preparación de las concentraciones de ensayo**

15. La sustancia problema se mezcla con el suelo. Los disolventes orgánicos utilizados para facilitar el tratamiento del suelo con la sustancia problema deben seleccionarse sobre la base de su baja toxicidad para los ácaros y debe incluirse en el diseño del ensayo un control adecuado de los disolventes (véase el punto 29).

*Sustancia problema hidrosoluble*

16. Se prepara una solución de la sustancia problema en agua desionizada en una cantidad suficiente para todas las réplicas de una sola concentración de ensayo. Se recomienda utilizar una cantidad apropiada de agua para conseguir el contenido necesario de humedad, es decir, entre el 40 y el 60 % de la capacidad máxima de retención de agua (véase el punto 12). Cada una de las soluciones de la sustancia problema se mezcla a fondo con un lote de suelo prehumedecido antes de introducirla en el recipiente de ensayo.

▼M6

*Sustancia problema no hidrosoluble*

17. En el caso de las sustancias no hidrosolubles en el agua, pero solubles en disolventes orgánicos, la sustancia problema puede disolverse en el volumen mínimo posible de un vehículo adecuado (por ejemplo, acetona). Solo deben utilizarse disolventes volátiles. Cuando se utilicen tales vehículos, todas las concentraciones de ensayo y el control deben contener la misma cantidad mínima del vehículo. El vehículo se rocía sobre una pequeña cantidad, como, por ejemplo, 10 g de arena de cuarzo fina, o se mezcla con ella. El contenido de arena total del sustrato debe corregirse para tener en cuenta esta cantidad. El vehículo se elimina por evaporación bajo una campana extractora durante al menos una hora. Esta mezcla de arena de cuarzo y sustancia problema se añade al suelo prehumedecido y se mezcla completamente, añadiendo la cantidad adecuada de agua desionizada para obtener la humedad necesaria. La mezcla final se introduce en los recipientes de ensayo. Obsérvese que algunos disolventes pueden ser tóxicos para los ácaros. Se recomienda, por tanto, utilizar un control de agua adicional sin vehículo, si no se conoce la toxicidad del disolvente para los ácaros. Si se demuestra adecuadamente que el disolvente (en las concentraciones que deben aplicarse) no tiene ningún efecto, puede excluirse el control de agua.

*Sustancia problema poco soluble en agua y en disolventes orgánicos*

18. En el caso de sustancias poco solubles en agua y en disolventes orgánicos, se mezcla el equivalente de 2,5 g de arena de cuarzo finamente molida por recipiente de ensayo (por ejemplo, 10 g de arena de cuarzo fina para cuatro réplicas) con la cantidad de sustancia problema necesaria para obtener la concentración de ensayo deseada. El contenido de arena total del sustrato debe corregirse para tener en cuenta esta cantidad. Esta mezcla de arena de cuarzo y sustancia problema se añade al suelo prehumedecido y se mezcla completamente después de añadir la cantidad adecuada de agua desionizada para obtener el contenido necesario de humedad. La mezcla final se divide entre los recipientes de ensayo. Se repite el procedimiento con cada concentración de ensayo, y se prepara asimismo un control adecuado.

PROCEDIMIENTO

**Grupos de ensayo y controles**

19. Se recomienda utilizar en cada recipiente de control y de tratamiento diez hembras adultas en 20 g de peso seco de suelo artificial. Los organismos de ensayo deben añadirse en el plazo de dos horas tras la preparación del sustrato de ensayo final (es decir, después de la aplicación de la sustancia problema). En casos específicos (por ejemplo, si el envejecimiento se considera un factor determinante), puede prolongarse el tiempo transcurrido entre la preparación del sustrato de ensayo final y la adición de los ácaros [para más detalles de este envejecimiento, véase (18)]. Sin embargo, en tales casos debe proporcionarse una justificación científica.

20. Después de añadir los ácaros al suelo, se les aporta alimento y debe medirse el peso inicial de cada recipiente de ensayo, para utilizarlo de referencia en la supervisión del contenido de humedad del suelo a lo largo de todo el ensayo, como se describe en el punto 24. Los recipientes de ensayo se cubren entonces, como se describe en el punto 8, y se colocan en la cámara de ensayo.

21. Se preparan controles adecuados para cada uno de los métodos de aplicación de la sustancia problema descritos en los puntos 15 a 18. Para preparar los controles se siguen los procedimientos pertinentes descritos, salvo que no se añade la sustancia problema. Por lo tanto, en su caso, se utilizan en los controles disolventes orgánicos, arena de cuarzo u otros vehículos, en concentraciones y cantidades como en los tratamientos. Cuando se utiliza un disolvente u otro vehículo para añadir la sustancia problema, debe prepararse y someterse a ensayo un control adicional sin sustancia problema y sin vehículo en caso de que no se conozca la toxicidad del disolvente (véase el punto 17).

▼M6

**Condiciones del ensayo**

22. La temperatura de ensayo debe ser de 20 ± 2 °C. La temperatura debe registrarse al menos una vez al día y ajustarse cuando sea necesario. El ensayo se efectúa en ciclos controlados de luz y oscuridad (preferentemente 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con una iluminación de 400 a 800 lux en la zona de los recipientes de ensayo. En aras de la comparabilidad, dichas condiciones son las mismas que en otros ensayos ecotoxicológicos del suelo [p. ej., (15)].

23. Debe garantizarse el intercambio de gases por aireación de los recipientes de ensayo al menos dos veces por semana en caso de que se utilicen tapas de rosca. Si se utilizan tapas de gasa, deberá prestarse especial atención al mantenimiento del contenido de humedad del suelo (véanse los puntos 8 y 24).

24. Se controla que el contenido de agua del sustrato del suelo en los recipientes de ensayo se mantenga constante a lo largo de todo el ensayo, pesando periódicamente (p. ej., una vez por semana) los recipientes de ensayo y, en caso necesario, añadiéndoles agua. Las pérdidas se compensan en la medida de lo necesario con agua desionizada. El contenido de humedad durante el ensayo no debe diferir en más de un 10 % del valor inicial.

**Alimentación**

25. Se ha comprobado que los ácaros del queso [*Tyrophagus putrescentiae* (Schrank, 1781)] son una fuente de alimentación adecuada. También pueden ser adecuados los pequeños colémbolos [por ejemplo, juveniles de *Folsomia candida* (Willem, 1902) o de *Onychiurus fimatus* (19), (20)], los enquitreidos [por ejemplo, *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe, 1992)] o los nematodos [por ejemplo, *Turbatrix silusiae* (de Man, 1913)] (21). Se recomienda controlar los alimentos antes de utilizarlos en un ensayo. El tipo y la cantidad de los alimentos deben garantizar un número suficiente de juveniles para cumplir los criterios de validez (punto 6). Para la selección de la presa, debe considerarse el modo de acción de la sustancia problema (por ejemplo, un acaricida puede ser tóxico también para los ácaros de alimento, véase el punto 26).

26. Los alimentos deben aportarse *ad libitum* (pero cada vez una pequeña cantidad, como la punta de una espátula). A este fin, también puede utilizarse un extractor de baja succión como se propone en el ensayo con colémbolos o un pincel fino. Normalmente es suficiente aportar alimento al comienzo del ensayo y dos o tres veces por semana. Cuando resulte que la sustancia problema es tóxica para la presa, debe considerarse la posibilidad de aumentar la frecuencia de la alimentación, o de utilizar otra fuente.

**Selección de las concentraciones de ensayo**

27. El conocimiento previo de la toxicidad de la sustancia problema debe ayudar a la hora de seleccionar las concentraciones de ensayo apropiadas, por ejemplo gracias a un estudio de determinación del intervalo. Cuando sea necesario, se llevará a cabo un ensayo de determinación del intervalo con cinco concentraciones de la sustancia problema en el intervalo de 0,1-1 000 mg/kg de suelo seco, con al menos una réplica de los tratamientos y del control. La duración de la prueba de determinación del intervalo es de 14 días, tras los cuales se determinan la mortalidad de los ácaros adultos y el número de juveniles. El intervalo de concentraciones para el ensayo final debe elegirse preferentemente de manera que incluya las concentraciones a las que se ve afectado el número de juveniles, pero no la supervivencia de la generación materna. Esto, sin embargo, puede no ser posible para las sustancias que provocan efectos letales y subletales a concentraciones casi similares. La concentración con efecto (por ejemplo, $EC_{50}$, $EC_{25}$, $EC_{10}$) y el rango de concentraciones a las que resulta interesante el efecto de la sustancia problema tienen que estar abarcados entre las concentraciones incluidas en el ensayo. Extrapolar muy por debajo de la menor concentración que afecte a los organismos de ensayo o por encima de la mayor concentración estudiada debe limitarse a casos excepcionales, de los que deberá ofrecerse una explicación completa en el informe.

**Diseño experimental**

*Ensayos de relación dosis-respuesta*

28. Se proponen tres diseños sobre la base de las recomendaciones derivadas de otra prueba interlaboratorios [ensayo de reproducción de enquitreidos (22)].

▼M6

La conveniencia general de todos estos diseños fue confirmada por el resultado de la validación con *H. aculeifer*.

29. Al determinar el intervalo de concentraciones, debe tenerse en cuenta lo siguiente:

— para la determinación de una $EC_x$ (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{50}$), deben someterse a ensayo al menos doce concentraciones; se recomienda utilizar al menos dos réplicas de cada concentración de ensayo y seis réplicas de control; el factor de espaciado puede variar, es decir, ser igual o inferior a 1,8 en el intervalo de efecto previsto y superior a 1,8 a concentraciones superiores e inferiores;

— para la determinación de la NOEC deben someterse a ensayo al menos cinco concentraciones en serie geométrica; se recomienda utilizar cuatro réplicas de cada concentración de ensayo más ocho controles; las concentraciones deben estar espaciadas por un factor que no exceda de 2,0;

— un enfoque combinado permite la determinación tanto de la NOEC como de la $EC_x$; deben utilizarse ocho concentraciones de tratamiento en progresión geométrica; se recomienda utilizar cuatro réplicas de cada tratamiento más ocho controles; las concentraciones deben estar espaciadas por un factor que no exceda de 1,8.

*Ensayo límite*

30. Si no se observan efectos a la concentración máxima utilizada en el ensayo de determinación del intervalo (es decir, 1 000 mg/kg de peso seco de suelo), el ensayo definitivo de reproducción se puede realizar como ensayo límite, con una concentración de ensayo de 1 000 mg/kg de peso seco de suelo. El ensayo límite ofrecerá la oportunidad de demostrar que la NOEC o la $EC_{10}$ para la reproducción es superior a la concentración límite, reduciendo al mínimo el número de ácaros utilizados en el ensayo. Deben utilizarse ocho réplicas tanto para el suelo tratado como para el control.

**Duración del ensayo y mediciones**

31. Deben registrarse todas las eventuales diferencias observadas entre el comportamiento y la morfología de los ácaros en los recipientes de control y en los de tratamiento.

32. El día 14, los ácaros supervivientes se extraen del suelo utilizando calor o luz, u otro método adecuado (véase el apéndice 5). Se cuentan por separado el número de juveniles (es decir, larvas, protoninfas y deutoninfas) y el de adultos. Los eventuales ácaros adultos que no se encuentren en esta fase se registrarán como muertos, suponiendo que tales ácaros han muerto y se han descompuesto antes de la evaluación. La eficacia de la extracción debe validarse una o dos veces al año mediante controles con números conocidos de adultos y de juveniles. La eficacia debe ser superior al 90 % por término medio, combinando todas las fases de desarrollo (véase el apéndice 5). Los recuentos de adultos y de juveniles no se ajustarán para tener en cuenta la eficacia.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

33. En los puntos 36 a 41 figura información sobre los métodos estadísticos que pueden utilizarse para analizar los resultados del ensayo. Además debe consultarse el documento 54 de la OCDE sobre *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application* (31).

34. El parámetro principal del ensayo es el resultado reproductor, que aquí se refiere al número de juveniles producidos por recipiente de ensayo replicado

▼M6

(con 10 hembras adultas introducidas). El análisis estadístico requiere que se calculen la media aritmética (X) y la varianza ($s^2$) del resultado reproductor por tratamiento y por control. X y $s^2$ se utilizan en procedimientos de análisis de la varianza (ANOVA), tales como la prueba t de Student, el ensayo de Dunnett, o el ensayo de Williams, así como para el cálculo de los intervalos de confianza del 95 %.

*Nota:* Este parámetro principal es equivalente a la fecundidad medida como número de juveniles vivos producidos durante el ensayo, dividido por el número de madres introducidas al inicio del ensayo.

35. El número de hembras supervivientes en los controles sin tratar es un importante criterio de validez y ha de documentarse. Como en el ensayo de determinación del intervalo, también deben registrarse en el informe final todos los demás signos de naturaleza nociva.

**$EC_x$**

36. Los valores de $EC_x$, junto con sus correspondientes límites de confianza del 95 % inferior y superior para el parámetro descrito en el punto 34, se calculan utilizando métodos estadísticos apropiados (por ejemplo, análisis de probit, función logística o de Weibull, método de Spearman-Karber recortado o interpolación simple). Se obtiene una $EC_x$ insertando en la ecuación encontrada un valor correspondiente al x % de la media del control. Para calcular la $EC_{50}$ o alguna otra $EC_x$, las medias por tratamiento (X) deben someterse a análisis de regresión.

**NOEC/LOEC**

37. Cuando se pretenda determinar la NOEC/NOEL mediante análisis estadístico, será necesario disponer de estadísticas por recipiente (se considera que cada uno de los recipientes es una réplica). Se deben utilizar métodos estadísticos apropiados según el documento 54 de la OCDE sobre *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*. En general, los efectos adversos de la sustancia problema en comparación con el control se investigan utilizando contrastes de hipótesis unilaterales (inferiores) a $p \leq 0,05$. En los puntos siguientes se presentan ejemplos.

38. La distribución normal de los datos puede comprobarse, por ejemplo, con la prueba de la bondad del ajuste de Kolmogorov-Smirnov, la prueba de la relación del intervalo a la desviación típica (prueba R/s), o la prueba de Shapiro-Wilk) (bilateral, $p \leq 0,05$). Para comprobar la homogeneidad de la varianza pueden utilizarse las pruebas de Cochran, de Levene o de Bartlett (bilateral, $p \leq 0,05$). Si se cumplen los requisitos previos de los procedimientos de ensayos paramétricos (normalidad, homogeneidad de la varianza) puede efectuarse un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, seguido de pruebas de comparación múltiple. Las comparaciones múltiples (por ejemplo, prueba t de Dunnett) o las pruebas de tendencia de ajuste secuencial (p. ej., prueba de Williams en el caso de una relación dosis-respuesta monótona) pueden utilizarse para determinar si existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los controles y las diversas concentraciones de la sustancia problema (selección del ensayo recomendado de acuerdo con el documento 54 de la OCDE sobre *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*). De lo contrario, para determinar la NOEC y la LOEC deben utilizarse métodos no paramétricos (p. ej., prueba U de Bonferroni según Holm o prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra).

**Ensayo límite**

39. Si se realiza un ensayo límite (comparación del control y de un solo un tratamiento) y se cumplen los requisitos previos de procedimientos de ensayos paramétricos (normalidad, homogeneidad), pueden evaluarse las respuestas métricas con la prueba de Student (prueba t). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales (prueba t de Welch) o una prueba no paramétrica, tal como la prueba U de Mann-Whitney.

40. Para determinar la existencia de diferencias significativas entre los controles (control y control del disolvente), las réplicas de cada control pueden someterse a ensayo según lo descrito para el ensayo límite. En caso de que tales ensayos no detecten diferencias significativas, pueden agruparse todas

▼M6

las réplicas de control y de control del disolvente. En caso contrario, todos los tratamientos deben compararse con el control del disolvente.

**Informe del ensayo**

41. El informe del ensayo debe incluir al menos la información siguiente:

— *Sustancia problema*

— identidad de la sustancia problema, nombre, lote de fabricación, lote de acondicionamiento y número CAS, pureza;

— propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema [por ejemplo, log $K_{ow}$, hidrosolubilidad, presión de vapor, constante de Henry (H) y de preferencia información sobre el destino de la sustancia problema en el suelo].

— *Organismos de ensayo*

— identificación y proveedor de los organismos de ensayo, descripción de las condiciones de cultivo;

— intervalo de edad de los organismos de ensayo.

— *Condiciones del ensayo*

— descripción del diseño experimental y del procedimiento;

— datos de la preparación del suelo para el ensayo; especificación detallada de si se utiliza suelo natural (origen, historia, granulometría, pH, contenido de materia orgánica y, si se dispone de ella, clasificación del suelo);

— capacidad máxima de retención de agua del suelo;

— descripción de la técnica utilizada para aplicar la sustancia problema al suelo;

— datos de las sustancias auxiliares utilizadas para la administración de la sustancia problema;

— tamaño de los recipientes de ensayo y peso seco de suelo de ensayo por recipiente;

— condiciones del ensayo: intensidad luminosa, duración de los ciclos de luz y oscuridad, temperatura;

— descripción del régimen alimentario, tipo y cantidad del alimento utilizado en el ensayo, fechas de alimentación;

— pH y contenido de agua del suelo al inicio del ensayo y durante el mismo (control y cada tratamiento);

— descripción detallada del método de extracción y eficacia de la extracción.

— *Resultados del ensayo*

— número de juveniles determinado en cada recipiente de ensayo al final del ensayo;

— número de hembras adultas y mortalidad de adultos (%) determinados en cada recipiente de ensayo al final del ensayo;

— descripción de los síntomas manifiestos o de los cambios claros de comportamiento;

— resultados obtenidos con la sustancia de referencia;

— estadísticas resumidas ($CE_x$ y/o NOEC) incluidos los límites de confianza del 95 % y descripción del método de cálculo;

▼**M6**

— representación gráfica de la relación concentración-respuesta;

— eventuales desviaciones respecto a los procedimientos descritos en el presente método de ensayo y cualquier acontecimiento inusual ocurrido en el ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Casanueva, M.E. (1993). Phylogenetic studies of the free-living and arthropod associated Laelapidae (Acari: Mesostigmata). Gayana Zool. 57, 21-46.

(2) Tenorio, J. M. (1982). Hypoaspidinae (Acari: Gamasida: Laelapidae) of the Hawaiian Islands. Pacific Insects 24, 259-274.

(3) Bakker, F.M., Feije, R., Grove, A. J., Hoogendorn, G., Jacobs, G., Loose, E.D. and van Stratum, P. (2003). A laboratory test protocol to evaluate effects of plant protection products on mortality and reproduction of the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* Canestrini (Acari: Laelapidae) in standard soil. JSS — Journal of Soils and Sediments 3, 73-77.

(4) Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Segunda edición en: Dahl, F. (Hrsg.): Die Tierwelt Deutschlands 59. Teil, G. Fischer, Jena, 523 pp.

(5) Ruf, A. (1991). Do females eat males?: Laboratory studies on the popualation development of *Hypoaspis aculeifer* (Acari: Parasitiformes). En: F. Dusbabek & V. Bukva (eds.): Modern Acarology. Academia Prague & SPD Academic Publishing bv, The Hague, Vol. 2, 487-492.

(6) Ruf, A. (1995). Sex ratio and clutch size control in the soil inhabiting predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Proc. 2nd Symp. EURAAC: p 241-249.

(7) Ruf, A. (1996). Life-history patterns in soil-inhabiting mesostigmatid mites. Proc. IXth Internat. Congr. Acarol. 1994, Columbus, Ohio: p 621-628.

(8) Krogh, P.H. and Axelsen, J.A. (1998). Test on the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* preying on the collembolan *Folsomia fimetaria*. En: Lokke, H. and van Gestel, C.A.M.: Handbook of soil invertebrate toxicity tests. John Wiley Sons, Chichester, p 239-251.

(9) Løkke, H., Janssen, C.R., Lanno, R.P., Römbke, J., Rundgren, S. and Van Straalen, N.M. (2002). Soil Toxicity Tests — Invertebrates. En: Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. Fairbrother, A., Glazebrook, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. (eds.). SETAC Press, Pensacola, USA. 128 pp.

(10) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1991/92). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina). Teil 1: Biologie der Bodenraubmilbe Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1883 (Gamasina) unter Laborbedingungen. Zool. Beiträge, 34, 395-433.

(11) Schlosser, H.-J. and Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Boden-raubmilben (Gamasina). Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. N.F. 34, 413-433.

(12) Heckmann, L.-H., Maraldo, K. and Krogh, P. H. (2005). Life stage specific impact of dimethoate on the predatory mite Hypoaspis aculeifer Canestrini (Gamasida: Laelapidae). Environmental Science & Technology 39, 7154-7157.

(13) Petersen, H. (1978). Some properties of two high-gradient extractors for soil microarthropods, and an attempt to evaluate their extraction efficiency. Natura Jutlandica 20, 95-122.

(14) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1994). Calidad del suelo. Determinación del pH, n$^{o}$ 10390. ISO, Ginebra.

▼**M6**

(15) Capítulo C.8 del presente anexo. Toxicidad para gusanos de tierra.

(16) OEPP (2003). EPPO Standards. Environmental risk assessment scheme for plant protection products. Chapter 8. Soil Organisms and Functions. Bull. OEPP/EPPO Bull. 33, 195-209.

(17) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1993). Calidad del suelo. Determinación de la materia seca y del contenido en agua en términos de masa. Método gravimétrico, nº 11465. ISO, Ginebra.

(18) Fairbrother, A., Glazebrock, P.W., Van Straalen, N.M. and Tarazona, J.V. 2002. Test Methods to Determine Hazards of Sparingly Soluble Metal Compounds in Soils. SETAC Press, Pensacola, FL, EE.UU.

(19) Chi, H. 1981. Die Vermehrungsrate von Hypoaspis aculeifer Canestrini (Acarina, Laelapidae) bei Ernährung mit Onychiurus fimatus Gisin (Collenbola). Ges.allg..angew. Ent. 3:122-125.

(20) Schlosser, H.J., und Riepert, F. 1992. Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilden (Gamasina). Zool.Beitr. N.F. 34(3):395-433.

(21) Heckmann, L.-H., Ruf, A., Nienstedt, K. M. and Krogh, P. H. 2007. Reproductive performance of the generalist predator Hypoaspis aculeifer (Acari: Gamasida) when foraging on different invertebrate prey. Applied Soil Ecology 36, 130-135.

(22) Capítulo C.32 del presente anexo. Ensayo de reproducción de enquitreidos.

(23) ISO (Organización Internacional de Normalización) (1994). Calidad del suelo: Efectos de los contaminantes sobre las lombrices de tierra (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción, nº 11268-2. ISO, Ginebra.

(24) Southwood, T.R.E. (1991). Ecological methods. With particular reference to the study of insect populations. (2nd ed.). Chapman & Hall, Londres, 524 pp.

(25) Dunger, W. and Fiedler, H.J. (1997). Methoden der Bodenbiologie (2nd ed.). G. Fischer, Jena, 539 pp.

(26) Lesna, I. and Sabelis, M.W. (1999). Diet-dependent female choice for males with «good genes» in a soil predatory mite. Nature 401, 581-583.

(27) Ruf, A. (1989). Die Bedeutung von Arrhenotokie und Kannibalismus für die Populationsentwicklung von Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Acari, Gamasina). Mitt. Deut. Ges. Allg. Angew. Ent. 7, 103-107.

(28) Ruf, A. (1993). Die morphologische Variabilität und Fortpflanzungsbiologie der Raubmilbe Hypoaspis aculeifer (Canestrini 1883) (Mesostigmata, Dermanyssidae). Tesis doctoral, Universidad de Bremen.

(29) Ignatowicz, S. (1974). Observations on the biology and development of Hypoaspis aculeifer Canestrini, 1885 (Acarina, Gamasides). Zoologica Poloniae 24, 11-59.

(30) Kevan, D.K. McE. and Sharma, G.D. (1964). Observations on the biology of Hypoaspis aculeifer (Canestrini, 1884), apparently new to North America (Acarina: Mesostigmata: Laelaptidae). Acarologia 6, 647-658.

(31) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 54. ENV/JM/MONO(2006)18.

▼**M6**

*Apéndice 1*

**Definiciones**

En este método de ensayo se aplican las siguientes definiciones (en este ensayo todas las concentraciones con efecto se expresan en masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo):

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**NOEC** (concentración sin efecto observado): concentración de la sustancia problema a la que no se observa ningún efecto. En este ensayo, la concentración correspondiente a la NOEC no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro de un determinado período de exposición en comparación con el control.

**LOEC** (concentración mínima con efecto observado): concentración mínima de la sustancia problema que tiene un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro de un determinado período de exposición en comparación con el control.

**$EC_x$** (concentración con efecto al x %): concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado período de exposición cuando se compara con un control. Por ejemplo, una $EC_{50}$ es una concentración de la que se estima que causa un efecto sobre un parámetro de un ensayo en el 50 % de una población expuesta a lo largo de un determinado período de exposición.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼**M6**

*Apéndice 2*

**Determinación de la capacidad máxima de retención de agua del suelo**

Se considera que el siguiente método es adecuado para determinar la capacidad máxima de retención de agua del suelo. Se describe en el anexo C de la norma ISO DIS 11268-2: Calidad del suelo. Efectos de los contaminantes en lombrices (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción (23).

Se recoge una determinada cantidad (p. ej., 5 g) del sustrato de suelo de ensayo, utilizando un dispositivo adecuado de muestreo (tubo de barrena, etc.). Se cubre el fondo del tubo con un trozo de papel de filtro impregnado de agua y se coloca a continuación en un soporte en un baño de agua. El tubo debe sumergirse gradualmente hasta que el nivel del agua esté por encima del extremo superior del suelo. A continuación, se debe dejar en el agua alrededor de tres horas. Dado que no puede retenerse toda el agua absorbida por los capilares del suelo, la muestra de suelo debe dejarse escurrir durante un período de dos horas, colocando el tubo en un lecho de arena de cuarzo finamente molida muy húmeda y contenida en un recipiente tapado (para evitar que se seque). Después, la muestra debe pesarse y secarse hasta obtener una masa constante a 105 °C. La capacidad de retención de agua (WHC) puede calcularse entonces de la manera siguiente:

$$\mathrm{WHC(en\ porcentaje\ de\ masa\ seca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

donde:

S = masa del sustrato saturado de agua + masa del tubo + masa del papel de filtro

T = tara (masa del tubo + masa del papel de filtro)

D = masa seca del sustrato

▼M6

*Apéndice 3*

**Determinación del pH del suelo**

El siguiente método de determinación del pH de un suelo se basa en la descripción recogida en la norma ISO DIS 10390: Calidad del suelo. Determinación del pH (16).

Una determinada cantidad de suelo se seca a temperatura ambiente durante al menos 12 horas. A continuación se hace una suspensión del suelo (con al menos 5 gramos de este) en cinco veces su volumen de una solución 1 M de cloruro de potasio de grado analítico (KCl) o de una solución 0,01 M de cloruro de calcio de grado analítico ($CaCl_2$). Después de agitarla enérgicamente durante 5 minutos, se deja reposar la suspensión desde 2 horas como mínimo hasta 24 horas como máximo. El pH de la fase líquida se mide a continuación utilizando un pH-metro, que habrá sido calibrado antes de cada medición con una serie adecuada de soluciones amortiguadoras (p. ej., a un pH de 4,0 y 7,0).

▼M6

*Apéndice 4*

**Cría de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*, ácaros de alimento y sincronización del cultivo**

**Cría de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer*:**

Los cultivos pueden mantenerse en recipientes de plástico o en tarros de vidrio rellenos de una mezcla de yeso y carbón vegetal en polvo, en la proporción 9:1. El yeso puede mantenerse húmedo añadiendo unas gotas de agua destilada o desionizada, en caso necesario. Las temperaturas óptimas de cría son de 20 ± 2 °C; el régimen de luz/oscuridad no es pertinente para esta especie. Las presas pueden ser ácaros de las especies *Typrophagus putrescentiae* o *Caloglyphus* sp. (los ácaros de alimento deben tratarse con prudencia ya que pueden provocar alergias en los seres humanos), pero los nematodos, los enquitreidos y los colémbolos también pueden ser adecuados como presa. Su origen debe registrarse. El desarrollo de la población puede empezar con una sola hembra porque los machos se forman en huevos sin fecundar. Las generaciones se solapan en gran medida. Una hembra puede vivir al menos 100 días y puede depositar aproximadamente 100 huevos durante su vida. La tasa máxima de puesta de huevos la alcanzan entre los días 10 y 40 (tras hacerse adultas) y supone 2,2 huevos hembra$^{-1}$ día$^{-1}$. El tiempo de desarrollo desde la fase de huevo a la de hembra adulta es de unos 20 días a 20 °C. Deben mantenerse y tratarse varios cultivos previamente.

**Cría de *Typrophagus putrescentiae*:**

Los ácaros se mantienen en un recipiente de vidrio relleno de polvo fino de levadura de cerveza, que se pone en un cubo de plástico lleno de solución de $KNO_3$, a fin de impedir que se escapen los animales. Los ácaros de alimento se colocan encima de este polvo. Después, se mezclan cuidadosamente con el polvo (que ha de sustituirse dos veces por semana) con ayuda de una espátula.

**Sincronización del cultivo:**

Los especímenes que se utilicen en el ensayo deben ser de edad similar (de unos 7 días tras alcanzar la fase de adultos). A una temperatura de cría de 20 °C, esto se efectúa de la manera siguiente:

Se transfieren hembras a un recipiente de cría limpio y se añade suficiente alimento.

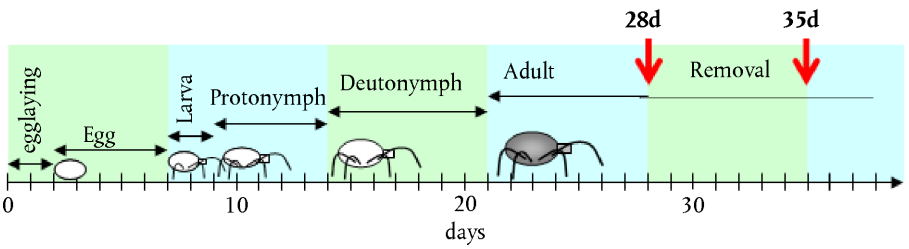
— Tras dejar dos o tres días para que puedan poner huevos, se retiran las hembras.

— Se toman hembras adultas para el ensayo cuando han pasado entre 28 y 35 días desde la fecha de inicio de la transferencia de las hembras a los recipientes de cría limpios.

Las hembras adultas pueden distinguirse con facilidad de los machos y de otras fases del desarrollo por su mayor tamaño, su forma inflada y su escudo dorsal marrón (los machos son más delgados y planos), y los juveniles son de color blanco a crema. El desarrollo de los ácaros sigue aproximadamente la pauta descrita a continuación a 20 °C (véase la figura): huevo 5 días, larva 2 días, protoninfa 5 días, deutoninfa 7 días, período previo a la puesta de huevos por la hembra 2 días. A partir de ese momento, los ácaros son adultos.

*Figura*

**Desarrollo de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* a 20 °C (retirada = hembras utilizadas para el ensayo).**



▼**M6**

Los animales de ensayo adultos se retiran del cultivo sincronizado y se introducen en los recipientes de ensayo cuando han pasado entre 28 y 35 días desde el momento en que las madres empezaron a poner huevos (es decir, 7-14 días desde que se han convertido en adultos). De esta manera se garantiza que los animales de ensayo han superado su período previo a la puesta de huevos y se han apareado con machos que también están presentes en el recipiente de cultivo. Según se deduce de observaciones efectuadas en cultivos de laboratorio, las hembras se aparean inmediatamente o poco después de convertirse en adultos si hay machos presentes (Ruf, Vaninnen, obs. pers.). El período de siete días se ha elegido para facilitar la integración en el trabajo del laboratorio y para amortiguar las diferencias de desarrollo individual de los ácaros. La puesta de huevos debe iniciarse con al menos el mismo número de hembras que se vaya a necesitar al final para el ensayo (si, por ejemplo, se van a necesitar 400 hembras para el ensayo, debe permitirse que pongan huevos al menos 400 hembras durante dos o tres días). El punto de partida para la población sincronizada deben ser al menos 1 200 huevos (la proporción de machos y hembras debe estar cerca de 1:1, y la mortalidad próxima a 0,2). Para evitar el canibalismo, es más práctico no mantener más de 20-30 hembras ponedoras de huevos en un mismo recipiente.

▼M6

*Apéndice 5*

**Métodos de extracción**

Para los microartrópodos, la extracción por calor es un método adecuado para separar los especímenes del suelo o sustrato (véase la figura a continuación). El método se basa en la actividad de los organismos, por lo que solo podrán registrarse los especímenes móviles. El principio de la extracción por calor es ir empeorando gradualmente las condiciones que ofrece la muestra a los organismos, a fin de que estos abandonen el sustrato y caigan a un líquido de fijación (por ejemplo, etanol). Los puntos cruciales son la duración de la extracción y el gradiente de condiciones para los organismos, de buenas a moderadas y de moderadas a malas. La duración de la extracción para realizar ensayos ecotoxicológicos tiene que ser lo más breve posible, ya que un eventual crecimiento de la población durante la fase de extracción podría falsear los resultados. Por otra parte, las condiciones de temperatura y humedad de la muestra han de estar siempre en un intervalo que permita a los ácaros moverse. El calentamiento de la muestra de suelo lleva a la desecación del sustrato. Si la desecación es demasiado rápida, algunos ácaros podrían desecarse también antes de conseguir escapar.

Por lo tanto, se propone el siguiente procedimiento (24) (25):

Aparato: Embudo Tullgren o métodos comparables como, por ejemplo, el de McFadyen (calentamiento desde arriba, la muestra se pone sobre un embudo).

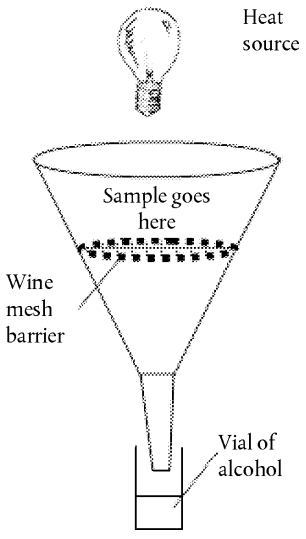
Régimen de calefacción: 25 °C durante 12 h, 35 °C durante 12 h, 45 °C durante 24 horas (en total, 48 h). La temperatura debe medirse en el sustrato.

Líquido de fijación: etanol al 70 %.

Detalles: Tomar el frasco de vidrio utilizado para el ensayo. Retirar la tapa y cubrir la boca con un trozo de malla o de tela. La tela utilizada debe tener una luz de malla de 1,0 a 1,5 mm; se fija con una goma elástica. Con cuidado se pone boca abajo el frasco y se introduce en el aparato de extracción. La tela impide que el sustrato caiga al líquido de fijación, pero permite que los ácaros salgan de la muestra. Se pone en marcha el régimen de calefacción después de haber introducido todos los frascos. Se finaliza la extracción a las 48 horas. Se retiran los frascos de fijación y se efectúa el recuento de los ácaros por medio de un microscopio de disección.

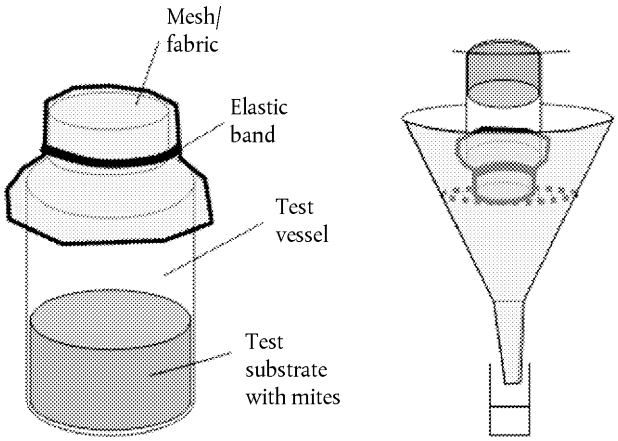
La eficacia de extracción del método elegido debe haberse demostrado una o dos veces al año con recipientes que contengan un número conocido de ácaros juveniles y de adultos en sustrato de ensayo sin tratar. La eficacia debe ser ≥ 90 % por término medio, combinando todas las fases de desarrollo.

**Dispositivo de extracción tipo Tullgren**



▼**M6**

Cómo preparar el frasco de ensayo una vez terminado el ensayo, antes de la extracción



▼**M6**

*Apéndice 6*

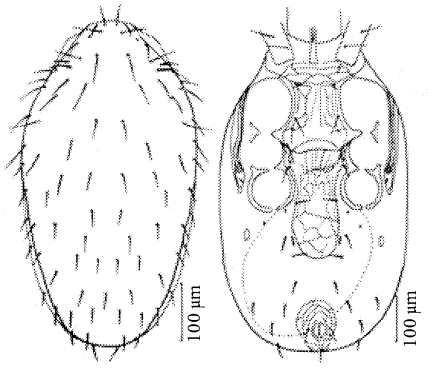
**Identificación de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer***

| Subclase/orden/suborden: | Familia: | Género/subgénero/especie: |
|---|---|---|
| Acari/Parasitiformes/Gamasida | Laelapidae | *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer* |

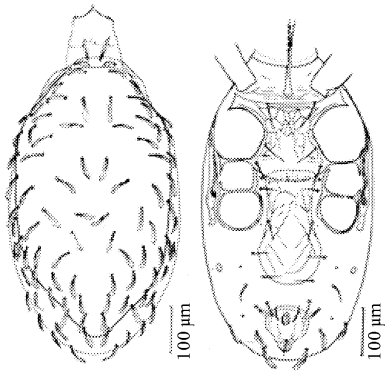
| | |
|---|---|
| Autor y fecha: | F. Faraji, Ph.D. (MITOX), 23 de enero de 2007 |

| | |
|---|---|
| Bibliografía utilizada | Karg, W. (1993). Die freilebenden Gamasina (Gamasides), Raubmilben. Tierwelt Deutschlands 59, 2ª edición revisada: 1-523.<br>Hughes, A.M. (1976). The mites of stored food and houses. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Technical Bulletin 9: 400 pp.<br>Krantz, G.W. (1978). A manual of Acarology. Oregon State University Book Stores, Inc., 509 pp. |

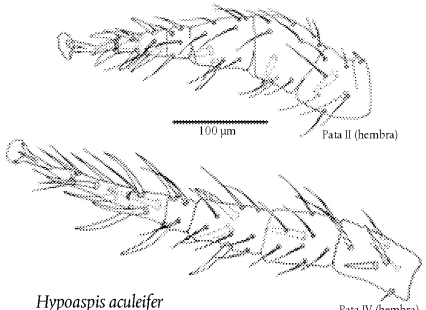
| | |
|---|---|
| Características determinantes: | Rostro con borde denticulado redondeado; surcos del hipostoma con más de 6 denticulos; sedas dorsales caudales Z4 no muy largas; sedas dorsales setiformes; escudo genital normal, no muy agrandado y sin alcanzar el escudo anal; mitad posterior del escudo dorsal sin sedas desemparejadas; patas II y IV con algunas macrosedas gruesas; seda dorsal Z5 unas dos veces más larga que la J5; dedo fijo de los quelíceros con 12-14 dientes y dedo móvil con 2 dientes; idiosoma 520-685 µm de largo.<br>La especie *Hypoaspis miles* también se utiliza en la lucha biológica y podría confundirse con *H. aculeifer*. La principal diferencia es la siguiente:<br>*H. miles* pertenece al subgénero *Cosmolaelaps* y tiene sedas dorsales en forma de cuchilla, mientras que *H. aculeifer* pertenece al subgénero *Geolaelaps* y tiene sedas dorsales setiformes. |



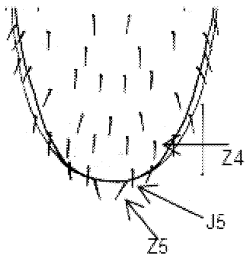

*Hypoaspis aculeifer* Según Hughes, 1976




*Hypoaspis miles Según Hughes,* 1976




*Hypoaspis aculeifer*
*Dibujos originales de F. Faraji*




*Hypoaspis aculeifer,*
*escudo dorsal con las sedas características*

▼M6

*Apéndice 7*

**Información básica sobre la biología de *Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer***

La especie *Hypoaspis aculeifer* pertenece a la familia Lealapidae, orden Acari (ácaros), clase Arachnida, tribu Arthropoda. Vive en todos los tipos de suelo y se alimenta de otros ácaros, nematodos, enquitreidos y colémbolos (26). En caso de escasez de alimento se hacen caníbales (27). Los ácaros predadores están segmentados en idiosoma y gnatosoma. No hay una diferenciación clara del idiosoma en prosoma (cabeza) y opistosoma (abdomen). El gnatosoma (escudo capitular) contiene las piezas para la alimentación, como son los palpos y quelíceros. Los quelíceros están trifurcados y provistos de dientes de forma distinta. Además de para alimentarse, los machos utilizan los quelíceros principalmente para transferir los espermatóforos a las hembras. El idiosoma está cubierto casi completamente por un escudo dorsal. Una gran parte del idiosoma de las hembras está ocupada por los órganos reproductores, que destacan en particular poco antes de la puesta de huevos. Ventralmente se encuentran dos escudos, el esternal y el genital. Todas las patas están provistas de cerdas y espinas. Las cerdas se utilizan para sujetarse cuando se desplazan en el interior o en la superficie del suelo. El primer par de patas se utiliza principalmente como antenas. El segundo par de patas se utiliza no solo para el movimiento, sino también para agarrar la presa. Las espinas del cuarto par de patas pueden servir de protección así como de «motor de desplazamiento» (28). Los machos tienen 0,55-0,65 mm de longitud y un peso de 10-15 µg. Las hembras tienen 0,8-0,9 mm de longitud y un peso de 50-60 µg (8) (28) (figura 1).

*Figura 1.*

**Hembra, macho, protoninfa y larva de *H. aculeifer*.**



A 23 °C, los ácaros maduran sexualmente a los 16 días (hembras) y 18 días (machos), respectivamente (6). Las hembras portan el esperma por el solenostoma, de donde se transfiere a continuación al ovario. En el ovario el esperma madura y se conserva. La fertilización se realiza únicamente después de la maduración del esperma en el ovario. Los huevos fecundados y sin fecundar son depositados por las hembras en agregados o por separado, de preferencia en cavidades o agujeros. Las hembras que se han apareado pueden producir juveniles de ambos sexos, mientras que de los huevos de hembras que no se han apareado solo salen juveniles machos. Durante el desarrollo se pasa por cuatro fases hasta llegar a la etapa de adulto (huevo — larva, larva — protoninfa, protoninfa — deutoninfa, deutoninfa — adulto).

El huevo es de color blanco lechoso, hialino, elíptico y de unos 0,37 mm de longitud, con una cubierta sólida. Según (8), las larvas tienen un tamaño entre 0,42 y 0,45 mm. Solo tienen tres pares de patas. En la región de la cabeza se desarrollan palpos y quelíceros. Los quelíceros, que tienen unos cuantos dentículos, se utilizan para la eclosión de los huevos. Tras la primera muda, 1-2 días después de la eclosión, se desarrollan las protoninfas. También son de color blanco, tienen un tamaño de 0,45-0,62 mm (8) y cuatro pares de patas. En los quelíceros están totalmente presentes los dientes. A partir de esta fase, los ácaros empiezan a buscar comida. Con este fin, la cutícula de las presas se perfora con

▼**M6**

los quelíceros y se introduce en la presa una secreción para la digestión extraintestinal. El ácaro puede entonces aspirar la masa alimentaria. Los quelíceros pueden también utilizarse para arrancar partículas mayores de pepitas alimentarias (28). Tras una nueva muda se forman las deutoninfas. Tienen un tamaño de 0,60-0,80 mm (8) y son de color amarillo a marrón claro. A partir de esta fase pueden distinguirse las hembras y los machos. Tras una nueva muda, durante la cual los animales están inactivos y se forma el escudo marrón (aproximadamente después de 14 días), los ácaros son adultos (28) (29) (30). La duración de su vida está entre 48 y 100 días a 25 °C (27).

▼**M6**

*Apéndice 8*

**Resumen Y calendario de las principales acciones que deben emprenderse a fin de realizar el ensayo con *Hypoaspis***

| Tiempo (días)<br>Inicio del ensayo = día 0 | Actividad/tarea |
|---|---|
| Día – 35<br>a día – 28 | Transferencia de las hembras a partir del cultivo madre a recipientes limpios para iniciar la sincronización<br>Dos días después: extracción de las hembras<br>Dos o tres veces por semana: aporte de alimento suficiente |
| Día -5 (+/– 2) | Preparación del suelo artificial |
| Día -4 (+/– 2) | Determinación de la WHC del suelo artificial<br>Secado durante una noche<br>Día siguiente: Pesada de muestras y cálculo de la WHC |
| Día – 4 (+/– 2) | Prehumidificación del suelo artificial para alcanzar entre el 20 y el 30 % de la WHC |
| Día 0 | Inicio del ensayo: adición de la sustancia problema al suelo artificial<br>Introducción de 10 hembras en cada réplica<br>Pesada de cada réplica<br>Establecimiento de controles abióticos para determinar el grado de humedad y el pH, dos réplicas por cada tratamiento<br>Secado de los controles de humedad durante una noche<br>Día siguiente: pesada de los controles de humedad<br>Día siguiente: medición del pH de los controles abióticos secados |
| Días 3, 6, 9, 12 (aprox.) | Aporte de la suficiente cantidad de organismos de presa a cada réplica<br>Pesada de cada réplica y adición eventual de la cantidad de agua evaporada |
| Día 14 | Finalización del ensayo, inicio de la extracción de todas las réplicas y de los controles de eficacia de la extracción<br>Secado del contenido de agua de los controles durante una noche<br>Día siguiente: pesada del contenido de agua de los controles<br>Día siguiente: medición del pH de los controles secados |
| Día 16 | Finalización de la extracción |
| Día 16 + | Registro del número de adultos y de juveniles en el material extraído<br>Informe de los resultados en los cuadros del modelo<br>Informe del procedimiento de ensayo en las fichas del protocolo del ensayo. |

▼M6

## C.37. ENSAYO DE VEINTIÚN DÍAS EN PECES: CRIBADO A CORTO PLAZO DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA Y ANDROGÉNICA Y DE LA INHIBICIÓN DE LA AROMATASA

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 230 de la OCDE (2009). La necesidad de desarrollar y validar un ensayo en peces capaz de detectar determinadas sustancias con actividad endocrina radica en la preocupación de que los niveles medioambientales de sustancias puedan provocar efectos adversos tanto en los seres humanos como en la vida silvestre, debido a la interacción de dichas sustancias con el sistema endocrino. En 1998, la OCDE promovió una actuación de alta prioridad orientada a revisar las directrices existentes, así como a desarrollar otras nuevas para la selección y la evaluación de los alteradores endocrinos potenciales. Una faceta de esta actuación consistió en elaborar las directrices del ensayo para el cribado de sustancias activas sobre el sistema endocrino de especies de peces. El ensayo de cribado endocrino de veintiún días en peces se ha sometido a un amplio programa de validación, el cual consiste en varios estudios interlaboratorios con sustancias seleccionadas con el objeto de demostrar la pertinencia y la fiabilidad del ensayo en términos de detección de sustancias estrogénicas e inhibidoras de la aromatasa (1, 2, 3, 4, 5) en las tres especies de peces en estudio (el pez cabeza gorda, el medaka y el pez cebra). La detección de actividad androgénica es posible en el pez cabeza gorda y en el medaka, pero no en el pez cebra. El presente método de ensayo no permite la detección de sustancias antiandrogénicas. El trabajo de validación ha sido revisado por un grupo de expertos designados por los Coordinadores Nacionales del Programa de Directrices de Ensayo (6). El ensayo no se ha diseñado para identificar mecanismos específicos de alteración hormonal, ya que los animales del ensayo poseen un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG) intacto, que puede responder a las sustancias que afectan a dicho eje en diferentes niveles. El ensayo sobre reproducción de peces a corto plazo (TG 229 de la OCDE) incluye la fecundidad y, en su caso, la histopatología gonadal del pez cabeza gorda, así como todos los parámetros incluidos en el presente método de ensayo. Las TG 229 de la OCDE ofrecen un cribado de las sustancias que afectan a la reproducción mediante diversos mecanismos, incluidas las modalidades endocrinas. Este factor debe tenerse en cuenta antes de seleccionar el método de ensayo más adecuado.

2. El presente método de análisis describe un ensayo de cribado *in vivo* en el que peces macho sexualmente maduros y peces hembra que están desovando se mantienen en una misma ubicación y se exponen a una sustancia durante una parte limitada de su ciclo de vida (veintiún días). Al término del periodo de exposición de veintiún días, dependiendo de la especie utilizada, se miden uno o dos parámetros biomarcadores en machos y hembras que sirvan de indicadores de la inhibición de la aromatasa, de la actividad estrogénica o de la actividad androgénica de la sustancia problema. Estos parámetros son la vitelogenina (VTG) y caracteres sexuales secundarios. La vitelogenina se mide en el pez cabeza gorda, el medaka y el pez cebra, mientras que los caracteres sexuales secundarios se miden únicamente en el pez cabeza gorda y el medaka.

3. Este bioensayo sirve de ensayo de cribado *in vivo* en relación con determinados mecanismos de acción endocrinos y su aplicación debe considerarse en el contexto del «OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals» (Marco teórico para el estudio y la evaluación de los alteradores endocrinos de la OCDE) (28).

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. La vitelogenina se produce normalmente en el hígado de los vertebrados ovíparos hembra como respuesta a los estrógenos endógenos circulantes. Es un precursor de las proteínas de la yema de huevo y, una vez que se produce en el hígado, viaja a través del torrente sanguíneo hasta el ovario, donde los huevos en desarrollo la absorben y modifican. La vitelogenina apenas se detecta en el plasma de los peces hembra inmaduros y de los machos porque no tienen suficientes estrógenos en circulación; no obstante, el hígado puede sintetizar y secretar vitelogenina como respuesta a la estimulación estrogénica exógena.

▼M6

5. La medición de la vitelogenina sirve para detectar sustancias con distintos mecanismos de acción estrogénica. La detección de sustancias estrogénicas es posible gracias a la medición de la inducción de la vitelogenina en los peces macho, lo cual ha quedado suficientemente documentado en los estudios revisados por expertos científicos [por ejemplo, (7)]. La inducción de la vitelogenina también ha quedado demostrada tras la exposición a andrógenos aromatizables (8, 9). Una reducción del nivel circulante de estrógenos en las hembras, por ejemplo, mediante la inhibición de la aromatasa que convierte el andrógeno endógeno en el estrógeno natural 17β-estradiol, provoca una disminución del nivel de vitelogenina, lo cual se utiliza para detectar sustancias con propiedades inhibidoras de la aromatasa (10, 11). La relevancia biológica de la respuesta de la vitelogenina tras la inhibición de estrógenos o de la aromatasa ha quedado establecida y se ha documentado ampliamente. Sin embargo, es posible que la producción de VTG en las hembras también pueda verse afectada por la toxicidad general y por mecanismos de acción tóxicos no endocrinos como, por ejemplo, la hepatotoxicidad.

6. Se han logrado desarrollar varios métodos de medición de manera satisfactoria al tiempo que se han armonizado para el uso rutinario. Este es el caso de los métodos de enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) específicos para cada especie, que usan la inmunoquímica para la cuantificación de la vitelogenina producida en pequeñas muestras sanguíneas o hepáticas recogidas en distintos peces (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Se recogen muestras sanguíneas de pez cabeza gorda, homogeneizados de cabeza/cola o muestras sanguíneas de pez cebra y muestras hepáticas de medaka para medir la VTG. En el caso del medaka existe una buena correlación entre la VTG medida en la sangre y en el hígado (19). En el apéndice 6 se recogen los procedimientos recomendados para la recogida de muestras para el análisis de la vitelogenina. Hay una gran variedad de juegos de medición de la vitelogenina, los cuales deben basarse en un método ELISA específico para cada especie.

7. Los caracteres sexuales secundarios de los peces macho de determinadas especies son cuantificables y visibles externamente, además de responder a los niveles circulantes de andrógenos endógenos; este es el caso del pez cabeza gorda y del medaka, pero no así del pez cebra, que no posee caracteres sexuales secundarios cuantificables. Las hembras conservan la capacidad de desarrollar caracteres sexuales secundarios masculinos tras su exposición a sustancias androgénicas en el agua. Hay varios estudios disponibles en la bibliografía científica que documentan este tipo de respuesta en el pez cabeza gorda (20) y el medaka (21). Una disminución de los caracteres sexuales secundarios en los machos debería interpretarse con cautela debido a la baja potencia estadística y debe basarse en opiniones de expertos y en la ponderación de las pruebas. Dada la ausencia de caracteres sexuales secundarios cuantificables que respondan a las sustancias con acción androgénica, hay limitaciones en el uso del pez cebra en este ensayo.

8. En el pez cabeza gorda, el principal indicador de exposición androgénica exógena es el número de tubérculos nupciales ubicados en el hocico del pez hembra. En el medaka, el número de tubérculos papilares constituye el principal marcador de exposición exógena a sustancias androgénicas en las hembras. El apéndice 5A y el apéndice 5B presentan los procedimientos recomendados para la evaluación de los caracteres sexuales en el pez cabeza gorda y el medaka, respectivamente.

9. Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

10. En el ensayo, se exponen juntos en recipientes de ensayo peces macho y hembra con capacidad reproductora. Su edad adulta y capacidad reproductora permite diferenciar claramente cada sexo y, por lo tanto, permite realizar un análisis de cada parámetro en relación con el sexo y garantiza su sensibilidad con respecto a las sustancias exógenas. Al finalizar el ensayo, el sexo se confirma con un examen macroscópico de las gónadas tras la apertura ventral del abdomen con unas tijeras. En el apéndice 2 se incluye un resumen de las condiciones relevantes del bioensayo. El ensayo comienza normalmente con muestras de peces de una población en periodo

▼M6

de desove. No deben utilizarse animales senescentes. En la sección dedicada a la selección de los peces se incluyen pautas relativas a la edad de los peces y su capacidad reproductora. El ensayo se realiza con tres concentraciones de exposición a la sustancia, así como con un control del agua y, en caso necesario, un control del disolvente. Se utilizan dos recipientes o réplicas por tratamiento (cada recipiente contiene cinco machos y cinco hembras) con medaka y pez cebra, mientras que con el pez cabeza gorda se utilizan cuatro recipientes o réplicas por tratamiento (cada recipiente contiene dos machos y cuatro hembras). Esta distribución sirve para adaptarse al comportamiento territorial del pez cabeza gorda macho a la vez que mantiene una potencia suficiente del ensayo. La exposición se lleva a cabo durante veintiún días y el muestreo de peces se lleva a cabo en el vigesimoprimer día de exposición.

11. Cuando se realiza el muestreo el vigesimoprimer día, todos los animales son sacrificados de forma compasiva. Se miden los caracteres sexuales secundarios en el pez cabeza gorda y el medaka (véanse el apéndice 5A y el apéndice 5B); se recogen muestras de sangre para determinar la vitelogenina en el pez cebra y el pez cabeza gorda; también se pueden recoger muestras de la cabeza o cola para determinar la vitelogenina en el pez cebra (apéndice 6), además de recoger muestras hepáticas en el medaka para analizar la VTG (apéndice 6).

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL ENSAYO

12. Para que los resultados del ensayo sean aceptables, deben cumplirse las condiciones siguientes:

— la mortalidad en los controles del agua (o de disolvente) no ha de superar el 10 % al final del ensayo;

— la concentración de oxígeno disuelto ha de ser, al menos, del 60 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el periodo de exposición;

— en ningún momento del periodo de exposición la temperatura del agua debe variar en más de ± 1,5 °C entre los recipientes de ensayo y debe mantenerse en un intervalo de 2 °C dentro de las gamas establecidas para la especie de ensayo (apéndice 2); y

— debe haber pruebas disponibles para demostrar que las concentraciones de la sustancia problema en la solución se han mantenido debidamente dentro de un rango de ± 20 % de la media los valores medidos.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

13. Se empleará el equipo común de laboratorio y, en particular:

a) medidores de oxígeno y pH;

b) equipo para determinar la dureza y la alcalinidad del agua;

c) dispositivo adecuado de regulación de la temperatura, con supervisión preferiblemente continua;

d) recipientes de material químicamente inerte y con una capacidad adecuada a la carga y la densidad de población recomendadas (véase el apéndice 2);

e) sustrato de desove del pez cabeza gorda y del pez cebra (en el apéndice 4 figura la información necesaria); y

f) una balanza suficientemente exacta (esto es, exactitud de ± 0,5 mg).

▼M6

**Agua**

14. Puede utilizarse para el ensayo toda agua en la que la especie de ensayo muestre unas tasas de crecimiento y supervivencia a largo plazo adecuadas. Su calidad ha de ser constante a lo largo de todo el ensayo. El pH del agua debe hallarse entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de ± 0,5 unidades de pH. Deben tomarse periódicamente muestras para su análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación de la sustancia problema). Cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante, conviene proceder, por ejemplo, cada tres meses a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd y Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, $Cl^{-}$ y $SO_4^{2-}$), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, los análisis pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada seis meses). En el apéndice 3 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable.

**Soluciones de ensayo**

15. Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación de la sustancia problema en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad) para lograr la concentración adecuada de solución madre. No se recomienda usar un disolvente portador. Sin embargo, en el caso de que sea necesario usar un disolvente, debe realizarse un control de disolvente en paralelo y con la misma concentración de disolvente que en los tratamientos con la sustancia problema. En el caso de sustancias difíciles, un disolvente puede ser técnicamente la mejor solución. Debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas difíciles (22). La elección del disolvente vendrá determinada por las propiedades químicas de la sustancia. El documento de orientación de la OCDE recomienda un máximo de 100 µl/l, que debe respetarse. Sin embargo, una revisión reciente (23) puso de relieve otras cuestiones relativas al uso de disolventes para realizar ensayos sobre la actividad endocrina. Por lo tanto, se recomienda que la concentración del disolvente, en caso necesario, se reduzca al mínimo siempre que sea técnicamente posible (esto dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema).

16. Se utilizará un sistema de ensayo dinámico. Este tipo de sistemas aporta y diluye continuamente una solución madre de la sustancia problema (por ejemplo, bomba dosificadora, diluidor proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los caudales de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad, preferiblemente todos los días, y no deberían variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Debe evitarse el uso de tubos de plástico de baja calidad u otros materiales que puedan contener sustancias biológicamente activas. Al seleccionar el material para el sistema dinámico, debe tenerse en cuenta la posible adsorción de la sustancia problema a este material.

**Preparación de los peces**

17. Los peces de ensayo deben seleccionarse de una población de laboratorio, preferentemente de una misma población, que se mantenga al menos en las dos semanas antes del ensayo en condiciones de calidad del agua e iluminación similares a las del ensayo. Es importante que la tasa de carga y la densidad de población (las definiciones pueden consultarse en el apéndice 1) sean las adecuadas para la especie de ensayo utilizada (véase el apéndice 2).

18. Después de un periodo de adaptación de 48 horas, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

▼M6

— si la mortalidad es superior al 10 % de la población en siete días, se rechaza todo el lote;

— si la mortalidad se halla entre el 5 y el 10 % de la población, se prolonga otros siete días el periodo de aclimatación; si durante este segundo periodo la mortalidad supera el 5 %, se rechaza todo el lote;

— si la mortalidad es inferior al 5 % de la población en siete días, se acepta el lote.

19. Los peces no deben recibir tratamiento terapéutico alguno durante el periodo de aclimatación, el periodo de preexposición ni durante el periodo de exposición.

**Preexposición y selección de los peces**

20. Se recomienda un periodo de preexposición de una semana, en el que los animales están en recipientes similares a los utilizados en el ensayo real. Los peces deben ser alimentados *ad libitum* durante todo el periodo de preparación y durante la fase de exposición. La fase de exposición comienza con peces adultos sexualmente dimórficos, procedentes de un suministro para laboratorio de animales maduros para la reproducción (por ejemplo, con caracteres sexuales secundarios visibles, en lo que respecta al pez cabeza gorda y al medaka) y en desove activo. Únicamente a modo de orientación general (esto es, no debe tenerse en cuenta sin atender a la situación reproductora real de un lote de peces determinado), los peces cabeza gorda deben tener aproximadamente 20 (± 2) semanas de edad, suponiendo que se hayan criado a 25 ± 2 °C durante toda su vida. Los medaka deben tener aproximadamente 16 (± 2) semanas, suponiendo que se hayan cultivado a 25 ± 2 °C durante toda su vida. Los peces cebra deben tener aproximadamente 16 (± 2) semanas, suponiendo que se hayan cultivado a 26 ± 2 °C durante toda su vida.

DISEÑO DEL ENSAYO

21. Se utilizan tres concentraciones de la sustancia problema, un control (agua) y, si es necesario, un control de disolvente. Los datos se pueden analizar con el objeto de determinar diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de los grupos de tratamiento y de los controles. Estos análisis indicarán si son necesarias otros ensayos a largo plazo para determinar efectos adversos (es decir, supervivencia, desarrollo, crecimiento y reproducción) de la sustancia, más que para su uso en la evaluación de riesgos (24).

22. En lo que respecta al pez cebra y al medaka, en el vigesimoprimer día del experimento se realiza un muestreo de machos y hembras de cada nivel de tratamiento (cinco machos y cinco hembras en cada una de las dos réplicas) y de los controles para medir la vitelogenina y los caracteres sexuales secundarios, si procede. En lo que respecta al pez cabeza gorda, en el vigesimoprimer día de exposición se realiza un muestreo de machos y hembras (dos machos y cuatro hembras en cada una de las cuatro réplicas) y de los controles para medir la vitelogenina y los caracteres sexuales secundarios.

**Selección de las concentraciones de ensayo**

23. A efectos de este ensayo, la concentración de ensayo máxima debe establecerse de acuerdo con la concentración máxima tolerada (en lo sucesivo, MTC, por sus siglas en inglés), la cual se determina mediante un ensayo de determinación de intervalo u otros datos de toxicidad, o fijarse en 10 mg/l o en la solubilidad máxima en agua, eligiéndose el valor que sea menor. La MTC se define como la concentración máxima de ensayo de la sustancia que redunda en una mortalidad inferior al 10 %. Con este planteamiento se asume que existen datos empíricos de toxicidad aguda u otros datos de toxicidad a partir de los cuales se puede estimar la MTC. La estimación de la MTC puede ser inexacta y, por lo general, debe aplicarse un juicio profesional.

▼M6

24. Se requieren tres concentraciones de ensayo, separadas por un factor constante no superior a 10, así como un control del agua de dilución (y un control de disolvente si es necesario). Se recomienda emplear una gama de factores de separación entre 3,2 y 10.

PROCEDIMIENTO

**Selección y pesada de los peces del ensayo**

25. Es importante que el peso de los peces varíe lo menos posible al inicio del ensayo. En el apéndice 2 figuran los intervalos de peso apropiados en cada una de las especies recomendadas para este ensayo. Para todo el lote de peces utilizado en el ensayo, el intervalo de pesos individuales de los peces macho y hembra al inicio del ensayo debe mantenerse, si es posible, en un intervalo de ± 20 % de la media aritmética del mismo sexo. Se recomienda pesar una submuestra de la población de peces antes del ensayo para calcular el peso medio.

**Condiciones de exposición**

*Duración*

26. La duración del ensayo es de veintiún días, tras un periodo de preexposición. El periodo de preexposición recomendado es una semana.

*Alimentación*

27. Los peces deben ser alimentados *ad libitum* con alimentos adecuados (apéndice 2) a un ritmo suficiente para mantener la condición física. Debe tenerse cuidado para evitar el crecimiento microbiano y la turbidez del agua. Como pauta general, la ración diaria puede dividirse en dos o tres porciones iguales para realizar varias tomas al día y deben transcurrir al menos tres horas entre cada toma. Una sola ración mayor resulta aceptable, especialmente los fines de semana. La alimentación de los peces debe suprimirse durante las 12 horas anteriores a la toma de muestras o la autopsia.

28. Se debe evaluar la presencia de contaminantes en la comida de los peces, como plaguicidas organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o bifenilos policlorados (PCB). Deben evitarse los alimentos con un alto nivel de fitoestrógenos que puedan comprometer la respuesta del ensayo a agonistas de estrógenos conocidos (por ejemplo, el 17 beta-estradiol).

29. La comida sobrante y la materia fecal deben retirarse de los recipientes de ensayo al menos dos veces por semana, por ejemplo, limpiando bien el fondo de cada recipiente con un sifón.

*Iluminación y temperatura*

30. El fotoperiodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (apéndice 2).

**Frecuencia de los análisis y mediciones**

31. Antes de que comience el periodo de exposición, debe garantizarse el funcionamiento correcto del sistema de distribución de la sustancia. Deben estar dispuestos todos los métodos analíticos, incluidos los conocimientos suficientes sobre la estabilidad química del sistema de ensayo. Durante el ensayo, las concentraciones de la sustancia problema se determinan a intervalos regulares, de la siguiente manera: los caudales de diluyente y de solución madre de la sustancia tóxica deben comprobarse preferentemente todos los días, pero al menos dos veces por semana, y no deben variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Se recomienda que las concentraciones reales de sustancia problema se midan en todos los recipientes al comienzo del ensayo y, posteriormente, cada semana.

32. Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. Sin embargo, si la concentración de sustancia problema en la solución se ha mantenido debidamente dentro del ± 20 % de la concentración nominal durante todo el ensayo, los resultados pueden basarse en los valores nominales o en los valores medidos.

33. En algunos casos puede estar indicado filtrar (por ejemplo, con un filtro de 0,45 μm de diámetro de poro) o centrifugar las muestras. En caso necesario, el procedimiento recomendado es el centrifugado. Sin embargo, si se demuestra que el material del ensayo no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración.

▼M6

34. Durante el ensayo deben medirse el oxígeno disuelto, la temperatura y el pH en todos los recipientes de ensayo, al menos una vez por semana. La dureza total y la alcalinidad deben medirse en los controles y en uno de los recipientes con la concentración más alta al menos una vez por semana. La temperatura debe someterse a supervisión continua al menos en un recipiente de ensayo.

**Observaciones**

35. En el transcurso del ensayo o al término del mismo, se evalúa una serie de respuestas biológicas generales (por ejemplo, la supervivencia) o básicas (por ejemplo, los niveles de vitelogenina). A continuación se describen la medición y la evaluación de estos parámetros y su utilidad.

*Supervivencia*

36. Durante el periodo del ensayo hay que examinarse diariamente los peces, registrar la mortalidad y retirar los peces muertos lo antes posible. Los peces muertos no deben ser reemplazados en los recipientes de control ni en los de tratamiento. El sexo de los peces que mueran durante el ensayo debe determinarse mediante la evaluación macroscópica de las gónadas.

*Comportamiento y aspecto*

37. Debe anotarse todo comportamiento anómalo (con respecto a los controles), tales como signos de toxicidad general, incluida la hiperventilación, la descoordinación al nadar, la pérdida de equilibrio o una inactividad o alimentación atípicas. También deben indicarse las anomalías externas (por ejemplo, hemorragia o decoloración). Estos signos de toxicidad deben considerarse detenidamente durante la interpretación de los datos, ya que pueden indicar concentraciones a las que los biomarcadores de la actividad endocrina no resultan fiables. Estas observaciones sobre el comportamiento también pueden proporcionar información cualitativa útil para los posibles requisitos futuros de ensayos en peces. Por ejemplo, se ha observado agresividad territorial en machos normales o hembras masculinizadas del pez cabeza gorda expuestos a andrógenos, mientras que en el pez cebra se ha observado el comportamiento característico del apareamiento y desove al amanecer se ha reducido u obstaculizado debido a una exposición estrogénica o antiandrogénica.

38. Como algunos elementos del aspecto (principalmente el color) pueden cambiar rápidamente con la manipulación, es importante que las observaciones cualitativas se realicen antes de retirar a los animales del sistema del ensayo. La experiencia hasta la fecha con el pez cabeza gorda sugiere que algunas sustancias con actividad endocrina pueden, inicialmente, inducir cambios en las siguientes características externas: color del cuerpo (claro u oscuro), patrones de coloración (presencia de franjas verticales) y forma del cuerpo (zona de la cabeza y del pecho). Por lo tanto, deben realizarse durante el ensayo y al término del estudio observaciones del aspecto físico de los peces.

*Sacrificio compasivo de los peces*

39. El vigesimoprimer día, es decir, al final de la exposición, los peces deben ser sacrificados con unas cantidades adecuadas de tricaína [metanosulfonato de tricaína, metacaína, MS-222 (CAS 886-86-2)], 100 — 500 mg/l, amortiguados con 300 mg/l de $NaHCO_3$ (bicarbonato sódico, CAS 144-55-8) para reducir la irritación de la membrana mucosa; a continuación se realiza un muestreo de sangre o tejido para determinar el nivel de vitelogenina, tal y como se explica en la sección dedicada a la vitelogenina.

▼**M6**

*Observación de los caracteres sexuales secundarios*

40. Algunas sustancias con actividad endocrina pueden inducir cambios en los caracteres sexuales secundarios especializados (número de tubérculos nupciales en el pez cabeza gorda macho o tubérculos papilares en el medaka macho). En particular, las sustancias con determinados mecanismos de acción pueden provocar la aparición anómala de caracteres sexuales secundarios en los animales del sexo opuesto; por ejemplo, los agonistas de los receptores de andrógenos, como la trembolona, la metiltestosterona y la dihidrotestosterona, pueden provocar que el pez cabeza gorda hembra desarrolle tubérculos nupciales pronunciados o que el medaka hembra desarrolle tubérculos papilares (11, 20, 21). También se ha observado que los agonistas receptores de estrógenos pueden reducir el número de tubérculos nupciales y el tamaño de la almohadilla dorsal en los machos adultos (25, 26). Estas observaciones morfológicas macroscópicas pueden proporcionar información cualitativa y cuantitativa útil para los posibles requisitos futuros de ensayos en peces. El número y el tamaño de los tubérculos nupciales en el pez cabeza gorda y de los tubérculos papilares en el medaka pueden cuantificarse directamente o, de manera más práctica, en especímenes conservados. Los procedimientos recomendados para la evaluación de los caracteres sexuales secundarios en el pez cabeza gorda y en el medaka se pueden consultar en el apéndice 5A y el apéndice 5B, respectivamente.

*Vitelogenina (VTG)*

41. Se extrae sangre de la arteria o de la vena caudal con un túbulo capilar para microhematocrito heparinizado o mediante una punción cardíaca con una jeringa. En función del tamaño de los peces, los volúmenes de sangre que se pueden extraer suelen oscilar entre los 5 y los 60 µl por individuo en el caso del pez cabeza gorda y entre los 5 y los 15 µl por individuo en el caso del pez cebra. El plasma se separa de la sangre mediante centrifugado y se guarda con inhibidores de la proteasa a – 80 °C hasta que se analice para determinar la vitelogenina. De manera alternativa, en el medaka se utilizará el hígado y en el pez cebra se puede usar el homogeneizado de cabeza/cola como tejido de origen para la determinación de la vitelogenina (apéndice 6). La medición de la VTG debe basarse en un método ELISA homólogo validado con ayuda de anticuerpos homólogos y de un patrón de VTG homólogo. Se recomienda utilizar un método capaz de detectar niveles de VTG tan bajos como unos pocos ng/ml de plasma (o ng/mg de tejido), que es el nivel de base en los peces macho no expuestos.

42. El control de calidad del análisis de la vitelogenina se realizará mediante patrones, blancos y, como mínimo, análisis duplicados. Para cada método ELISA debe realizarse una prueba del efecto de matriz (efecto de dilución de la muestra) para determinar el factor mínimo de dilución de la muestra. Cada placa ELISA utilizada en ensayos de VTG debe incluir las siguientes muestras de control de calidad: al menos 6 patrones de calibración que cubran la gama de concentraciones previstas de vitelogenina y al menos un blanco de ensayo de fijación no específico (analizado por duplicado). La absorbancia de estos blancos debe ser inferior al 5 % de la absorbancia máxima del patrón de calibración. Se analizarán como mínimo dos partes alícuotas (duplicados de pocillos) de cada dilución de la muestra. Los duplicados de los pocillos que varíen en más del 20 % deben volver a analizarse.

43. El coeficiente de correlación ($R^2$) de las curvas de calibración debe ser superior a 0,99. Sin embargo, una elevada correlación no es suficiente para garantizar una predicción adecuada de la concentración en todas las gamas. Además de tener una correlación suficientemente alta para la curva de calibración, la concentración de cada patrón, calculada a partir de la curva de calibración, debe encontrarse entre el 70 y 120 % de su concentración nominal. Si las concentraciones nominales presentan la tendencia de

▼M6

apartarse de la línea de regresión de calibración (por ejemplo, en concentraciones más bajas), es posible que sea necesario dividir la curva de calibración en rangos bajos y altos o utilizar un modelo no lineal para adaptar adecuadamente los datos de absorbancia. Si la curva se divide, ambos segmentos de línea deben tener un $R^2 > 0,99$.

44. El límite de detección (LOD) se define como la concentración más baja del patrón analítico, y el límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja del patrón analítico multiplicada por el factor de dilución más bajo.

45. Cada día que se realicen ensayos de vitelogenina, se analizará una muestra de enriquecimiento preparada con un patrón de referencia interensayos (apéndice 7). La relación entre la concentración prevista y la concentración medida se indicará junto con los resultados de cada conjunto de ensayos que se hayan realizado ese día.

DATOS E INFORME

**Evaluación de las respuestas de los biomarcadores mediante el análisis de la varianza (ANOVA)**

46. Para identificar la posible actividad endocrina de una sustancia, se comparan las respuestas entre los grupos de tratamiento y los grupos de control mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Cuando se usa un control de disolvente, debe realizarse una prueba estadística apropiada entre los controles de agua de dilución y los de disolvente para cada parámetro. En la OCDE, 2006c (27) pueden consultarse las directrices relativas a la gestión de los datos de los controles de agua de dilución y los de disolvente en posteriores análisis estadísticos. Todos los datos relativos a las respuestas biológicas deben analizarse y comunicarse por separado respecto a cada sexo. Si las hipótesis necesarias relativas a los métodos paramétricos no se cumplen –distribución no normal (por ejemplo, prueba de Shapiro-Wilk) o varianza heterogénea (prueba de Bartlett o Levene)–, deberá estudiarse la posibilidad de transformar los datos para homogeneizar las varianzas antes de efectuar el ANOVA o un ANOVA ponderado. En caso de relación dosis-respuesta no monótona puede utilizarse la prueba de Dunnett (paramétrica) sobre comparaciones de varios pares o un ajuste Mann-Whitney con Bonferroni (no paramétrico). Se pueden usar otras pruebas estadísticas (por ejemplo, la prueba de Jonckheere-Terpstra o la prueba de Williams) si la relación dosis-respuesta es aproximadamente monótona. En el apéndice 8 se incluye un diagrama de flujo estadístico como ayuda para la toma de decisiones en relación con la prueba estadística más adecuada. Asimismo, se puede obtener más información en el documento de la OCDE relativo a los enfoques actuales sobre el análisis estadístico de datos sobre ecotoxicidad (27).

**Preparación de informes sobre los resultados del ensayo**

47. Los datos del estudio deben incluir:

*Instalaciones de ensayo:*

— Personal responsable y sus tareas en el estudio.

— Cada laboratorio debe haber demostrado su competencia en el uso de una gama de sustancias representativas.

*Sustancia problema:*

— Caracterización de la sustancia problema.

— Naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes.

▼**M6**

— Método y frecuencia de preparación de las concentraciones de ensayo.

— Información sobre la estabilidad y la biodegradabilidad.

*Disolvente:*

— Caracterización del disolvente (naturaleza, concentración utilizada).

— Justificación de la elección del disolvente (si fuera distinto al agua).

*Animales de ensayo:*

— Especie y cepa.

— Proveedor e instalación específica del proveedor.

— Edad de los peces al comienzo del ensayo y estado reproductivo o de desove.

— Datos sobre el procedimiento de aclimatación de los animales.

— Peso corporal de los peces al principio de la exposición (a partir de una submuestra de la población de peces).

*Condiciones del ensayo:*

— Procedimiento de ensayo utilizado (tipo de prueba, tasa de carga, densidad de población, etc.).

— Método de preparación de las soluciones madre y caudal.

— Concentraciones nominales del ensayo, concentraciones medidas cada semana de las soluciones de ensayo y método analítico utilizado, medias de los valores medidos y desviaciones físicas de los recipientes de ensayo, así como pruebas de que las mediciones corresponden a las concentraciones de la sustancia del ensayo en la solución verdadera.

— Características del agua de dilución (incluido el pH, la dureza, la alcalinidad, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, los niveles residuales de cloro, el carbono orgánico total, los sólidos en suspensión y cualquier otra medición que se haya realizado).

— Calidad del agua dentro de los recipientes de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto.

— Información detallada sobre la alimentación (por ejemplo, tipo de alimentos, origen, cantidad suministrada y frecuencia) y análisis de los contaminantes pertinentes, si estuvieran disponibles (por ejemplo, PCB, HAP y plaguicidas organoclorados).

*Resultados*

— Pruebas de que los controles han cumplido los criterios de aceptación del ensayo.

— Datos sobre la mortalidad acaecida en cualquiera de las concentraciones y en los controles del ensayo.

— Técnicas de análisis estadístico utilizadas, tratamiento de los datos y justificación de las técnicas utilizadas.

— Datos relativos a las observaciones biológicas de morfología macroscópica, incluidos los caracteres sexuales secundarios y la vitelogenina.

▼M6

— Resultados de los análisis de datos, preferentemente en formato tabular y gráfico.

— Incidencia de toda reacción anómala de los peces y de todo efecto visible producido por la sustancia problema.

ORIENTACIÓN PARA LA INTERPRETACIÓN Y LA ACEPTACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

48. Esta sección contiene una serie de consideraciones que deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados del ensayo con respecto a los diversos parámetros medidos. Los resultados deben interpretarse con cautela cuando la sustancia problema parezca provocar una toxicidad manifiesta o afectar al estado general del animal de ensayo.

49. Al ajustar la gama de concentraciones del ensayo, se debe tener cuidado de no superar la concentración máxima tolerada, de forma que se pueda realizar una interpretación significativa de los datos. Es importante contar al menos con un tratamiento en el que no haya indicios de efectos tóxicos. Los signos de enfermedades y de efectos tóxicos deben evaluarse y registrarse exhaustivamente. Por ejemplo, es posible que la producción de VTG en las hembras también se vea afectada por la toxicidad general y mecanismos de acción tóxicos no endocrinos como, por ejemplo, hepatotoxicidad. No obstante, la interpretación de los efectos puede corroborarse con otros niveles de tratamiento que no se hayan visto afectados por la toxicidad sistémica.

50. Hay varios aspectos que deben tenerse en cuenta con respecto a la aceptación de los resultados del ensayo. Como pauta, los niveles de VTG en los grupos de control de machos y hembras deben diferenciarse y estar separados aproximadamente por tres órdenes de magnitud en el pez cabeza gorda y en el pez cebra, y aproximadamente por un orden de magnitud en el medaka. En los informes de validación (1, 2, 3, 4) figuran ejemplos de la gama de valores obtenidos en los grupos de control y de tratamiento. Los valores altos de VTG en los machos de control podrían comprometer la capacidad de respuesta del ensayo y su capacidad para detectar agonistas débiles de estrógenos. Los valores bajos de VTG en las hembras de control podrían comprometer la capacidad de respuesta del ensayo y su capacidad para detectar inhibidores de la aromatasa y antagonistas de los estrógenos. Para elaborar esta orientación se utilizaron los estudios de validación.

51. Si un laboratorio no hubiera realizado el ensayo antes o si se hubieran producido cambios importantes (por ejemplo, cambio de cepa o del proveedor de los peces), se aconseja realizar un estudio de competencia técnica. Se recomienda utilizar sustancias que abarquen una variedad de mecanismos de acción o de impactos en varios parámetros del ensayo. En la práctica, se insta a cada laboratorio a recopilar sus propios datos de control históricos relativos a los machos y a las hembras, así como a realizar controles positivos con una sustancia con actividad estrogénica (por ejemplo, el 17beta-estradiol a 100 ng/l o un agonista débil conocido) que se traduzca en un aumento de la VTG en los peces macho, con una sustancia inhibidora de la aromatasa (por ejemplo, fadrozol o procloraz a 300 μg/l) que dé como resultado una reducción de la VTG en los peces hembra, y con una sustancia con actividad androgénica (por ejemplo, 17beta-trembolona a 5 μg/l) que produzca la inducción de caracteres sexuales secundarios en las hembras del pez cabeza gorda y del medaka. Todos estos datos pueden compararse con los datos disponibles de los estudios de validación (1, 2, 3) para garantizar la competencia de los laboratorios.

52. En general, las mediciones de vitelogenina deben considerarse positivas si se produce un aumento estadísticamente significativo de la VTG en los machos ($p < 0,05$) o una disminución estadísticamente significativa en las hembras ($p < 0,05$), como mínimo en la dosis máxima del ensayo en comparación con el grupo de control y en ausencia de signos de toxicidad general. Un resultado positivo también se verá respaldado por la demostración de una relación biológicamente plausible entre la dosis y la curva de respuesta. Como se ha mencionado anteriormente, la reducción de vitelogenina podría no deberse totalmente a un origen endocrino; sin embargo, un resultado positivo, por lo general, se debe interpretar como una prueba de actividad endocrina *in vivo* y, normalmente, debe conllevar acciones para obtener más aclaraciones.

▼**M6**

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, ENV/JM/MONO(2006)27.

(2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, ENV/JM/MONO(2006)29.

(3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, ENV/JM/MONO(2007)25.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. Proyecto de CEFIC LRI, endocrino. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (acceso 18/09/08).

(5) US EPA 2007. Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. Informe no publicado del 15 de diciembre de 2007. Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE. UU., Washington, DC. 104 páginas.

(6) OCDE, 2008. Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, ENV/JM/MONO(2008)21.

(7) Sumpter and Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives;103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S, Sauer A, Shears JA, Tyler CR, Braunbeck T (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (Pimephales promelas) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L, Goto-Kazato R, Trant JM, Nash JP, Korsgaard B, Bjerregaard P (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley GT, Kahl MD, Jensen KM, Hornung MW, Korte JJ, Makynen EA, Leino RL (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (Pimephales promelas). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

(11) Panter GH, Hutchinson TH, Hurd KS, Sherren A, Stanley RD, Tyler CR (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV (1999). Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

▼**M6**

(13) Panter GH, Tyler CR, Maddix S, Campbell PM, Hutchinson TH, Länge R, Lye C, Sumpter JP, 1999. Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (Pimephales promelas) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Bruselas, Bélgica.

(14) Fenske M., van Aerle, R.B., Brack, S.C., Tyler, C.R., Segner, H., (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (Danio rerio Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H, Andersen L, Petersen GI, Korsgaard B, Pedersen KL, Bjerregaard P. (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J, Holbech H, Lindholst C, Noerum U, Povlsen A, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2002. Vitellogenin induction by 17ß-estradiol and 17ß-ethinylestradiol in male zebrafish (Danio rerio). Comp. Biochem. Physiol. C. 131: 531-539.

(17) Brion F, Nilsen BM, Eidem JK, Goksoyr A, Porcher JM, Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H, Morita H, Nakano N, Kang IJ, Tadokoro H, Oshima Y, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (Oryzias latipes). Jpn J Environ Toxicol 4:87–98.

(19) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T., 2004. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50:301-308.

(20) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Homung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray LE (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (Oryzias latipes). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. N$^{o}$ 23. París.

(23) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006a. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(24) Hutchinson TH, Ankley GT, Segner H, Tyler CR, 2006b. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts», not «traffic lights», in risk assessment. Environmental Health Perspectives;114 Suppl 1:106-14.

(25) Miles-Richardson, SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure to 17B-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (Pimephales promelas). Aquat. Lett., Suppl. 47, 129-145.

▼**M6**

(26) Martinovic, D., L.S. Blake, E.J. Durhan, K.J. Greene, M.D. Kahl, K.M., Jensen, E.A. Makynen, D.L. Villeneuve y G.T. Ankley. 2008. Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Microbiol. Lett., Suppl. Chem. Soc, pp. 27, 478-488.

(27) OCDE (2006c). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. OECD environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54. ENV/JM/MONO(2006)18

(28) OCDE (2012). OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters (revised). Annex I to Draft Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. Series on Testing and Assessment No 150. ENV/JM/MONO(2012)22

▼**M6**

*Apéndice 1*

**Abreviaturas y definiciones**

**Sustancia:** Sustancia o mezcla.

**CV:** Coeficiente de variación.

**ELISA:** Enzimoinmunoanálisis de adsorción.

**Tasa de carga:** Peso húmedo de los peces por volumen de agua.

**Densidad de población:** Número de peces por volumen de agua.

**VTG (vitelogenina):** Fosfolipoglucoproteína precursora de la proteína de la yema de huevo que normalmente se produce en las hembras sexualmente activas de todas las especies ovíparas.

**Eje HPG:** Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

**MTC:** Concentración máxima tolerada, que constituye aproximadamente el 10 % de $LC_{50}$.

**Sustancia problema:** Toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼**M6**

*Apéndice 2*

**Condiciones experimentales para el ensayo de cribado endocrino de peces**

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. Especies recomendadas | **Pez cabeza gorda** (*Pimephales romelas*) | **Medaka** (*Oryzias latipes*) | **Pez cebra** (*Danio rerio*) |
| 2. Tipo de ensayo | Dinámico | Dinámico | Dinámico |
| 3. Temperatura del agua | 25 ± 2 °C | 25 ± 2 °C | 26 ± 2 °C |
| 4. Calidad de la iluminación | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) |
| 5. Intensidad de la luz | 10-20 µE/$m^2$/s, 540-1 000 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) | 10-20 µE/$m^2$/s, 540-1 000 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) | 10-20 µE/$m^2$/s, 540-1 000 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) |
| 6. Fotoperiodo (las transiciones del amanecer o del anochecer son opcionales; sin embargo, no se han considerado necesarias) | 16 h de luz, 8 h de oscuridad | 12-16 h de luz, 12-8 h de oscuridad | 12-16 h de luz, 12-8 h de oscuridad |
| 7. Tasa de carga | < 5 g por l | < 5 g por l | < 5 g por l |
| 8. Tamaño del recipiente de ensayo | 10 l (mínimo) | 2 l (mínimo) | 5 l (mínimo) |
| 9. Volumen de la solución de ensayo | 8 l (mínimo) | 1,5 l (mínimo) | 4 l (mínimo) |
| 10. Sustituciones de volumen de las soluciones de ensayo | 6 diarias como mínimo | 5 diarias como mínimo | 5 diarias como mínimo |
| 11. Edad de los organismos de ensayo | Véase el punto 20. | Véase el punto 20. | Véase el punto 20. |
| 12. Peso húmedo aproximado de los peces adultos (g) | Hembras: 1,5 ± 20 %<br>Machos: 2,5 ± 20 % | Hembras: 0,35 ± 20 %<br>Machos: 0,35 ± 20 % | Hembras: 0,65 ± 20 %<br>Machos: 0,4 ± 20 % |
| 13. Número de peces por recipiente de ensayo | 6 (2 machos y 4 hembras) | 10 (5 machos y 5 hembras) | 10 (5 machos y 5 hembras) |
| 14. Número de tratamientos | = 3 (más los controles correspondientes) | = 3 (más los controles correspondientes) | = 3 (más los controles correspondientes) |
| 15. Número de recipientes por tratamiento | 4 como mínimo | 2 como mínimo | 2 como mínimo |
| 16. Número de peces por concentración de ensayo | 16 hembras adultas y 8 machos (4 hembras y 2 machos en cada recipiente replicado) | 10 hembras adultas y 10 machos (5 hembras y 5 machos en cada recipiente replicado) | 10 hembras adultas y 10 machos (5 hembras y 5 machos en cada recipiente replicado) |
| 17. Régimen de alimentación | Adultos o nauplios vivos o congelados de artemia salina dos o tres veces al día (*ad libitum*), alimentos disponibles comercialmente o una combinación de las opciones mencionadas | Nauplios de artemia salina dos o tres veces al día (*ad libitum*), alimentos disponibles comercialmente o una combinación de las opciones mencionadas | Nauplios de artemia salina dos o tres veces al día (ad libitum), alimentos disponibles comercialmente o una combinación de las opciones mencionadas |

▼M6

| | | | |
|---|---|---|---|
| 18. Aireación | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior al 60 % de la saturación del aire | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior al 60 % de la saturación del aire | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior al 60 % de la saturación del aire |
| 19. Agua de dilución | Agua superficial limpia, de pozo o reconstituida, o agua corriente desclorada | Agua superficial limpia, de pozo o reconstituida, o agua corriente desclorada | Agua superficial limpia, de pozo o reconstituida, o agua corriente desclorada |
| 20. Periodo de preexposición | Se recomiendan 7 días | Se recomiendan 7 días | Se recomiendan 7 días |
| 21. Duración de la exposición a la sustancia | 21 días | 21 días | 21 días |
| 22. Parámetros biológicos | Supervivencia<br>Comportamiento<br>Caracteres sexuales secundarios<br>VTG | Supervivencia<br>Comportamiento<br>Caracteres sexuales secundarios<br>VTG | Supervivencia<br>Comportamiento<br>VTG |
| 23. Aceptabilidad del ensayo | Oxígeno disuelto > 60 % de saturación; temperatura media de 25 ± 2 °C; 90 % de supervivencia de los peces en los controles; concentraciones medidas del ensayo dentro del 20 % de las medias medidas por nivel de tratamiento. | Oxígeno disuelto > 60 % de saturación; temperatura media de 24 ± 2 °C; 90 % de supervivencia de los peces en los controles; concentraciones medidas del ensayo dentro del 20 % de las medias medidas por nivel de tratamiento. | Oxígeno disuelto > 60 % de saturación; temperatura media de 26 ± 2 °C; 90 % de supervivencia de los peces en los controles; concentraciones medidas del ensayo dentro del 20 % de las medias medidas por nivel de tratamiento. |

▼**M6**

*Apéndice 3*

**Características químicas de un agua de dilución aceptable**

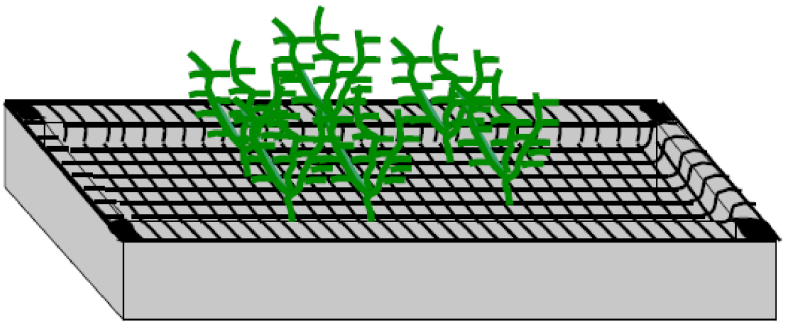
| Componente | CONCENTRACIONES |
|---|---|
| Partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

▼M6

*Apéndice 4A*

**SUSTRATO DE DESOVE DEL PEZ CEBRA**

**Bandeja de desove:** cualquier placa de instrumentos de vidrio; por ejemplo, 22 × 15 × 5,5 cm (largo x ancho x fondo), cubiertos con una rejilla de alambre de acero inoxidable extraíble (2 mm de abertura de malla). La rejilla debe cubrir la placa de instrumentos por debajo del nivel del borde.



El sustrato de desove debe estar fijado a la rejilla; debe proporcionar una estructura en la que los peces puedan introducirse. Por ejemplo, son adecuadas las plantas artificiales de acuario hechas de material plástico de color verde (*Nota:* Debe tenerse en cuenta la posible adsorción de la sustancia problema al material de plástico). El material de plástico debe lixiviarse en un volumen suficiente de agua caliente durante un tiempo para garantizar que no pasan sustancias al agua del ensayo. Cuando se utilicen materiales de vidrio, hay que asegurarse de que los peces no puedan resultar heridos ni quedar hacinados durante sus acciones vigorosas.

La distancia entre la bandeja y los paneles de vidrio debe ser de 3 cm como mínimo para garantizar que el desove no se realice fuera de la bandeja. Los huevos desovados en la bandeja caen a través de la rejilla y se puede recoger una muestra entre 45 y 60 minutos después de activar la iluminación. Los huevos transparentes no se adhieren y se pueden contar fácilmente con luz transversal. Cuando se utilicen cinco hembras por recipiente, una cantidad de hasta veinte huevos diarios puede considerarse una cifra baja, una cantidad de hasta 100 huevos se considera una cifra intermedia y una cantidad superior a 100 se considera una cifra alta. La bandeja de desove se retira para recoger los huevos, y se vuelve a introducir en el recipiente de ensayo, lo más tarde posible por la tarde o muy temprano por la mañana. El tiempo transcurrido hasta la reintroducción no debe superar una hora ya que, de lo contrario, la señal del sustrato de desove puede inducir algún apareamiento y desove a una hora poco habitual. Si la situación requiriera una introducción posterior de la bandeja de desove, debería hacerse al menos nueve horas después de activar la iluminación. A esta última hora del día ya no se induce el desove.

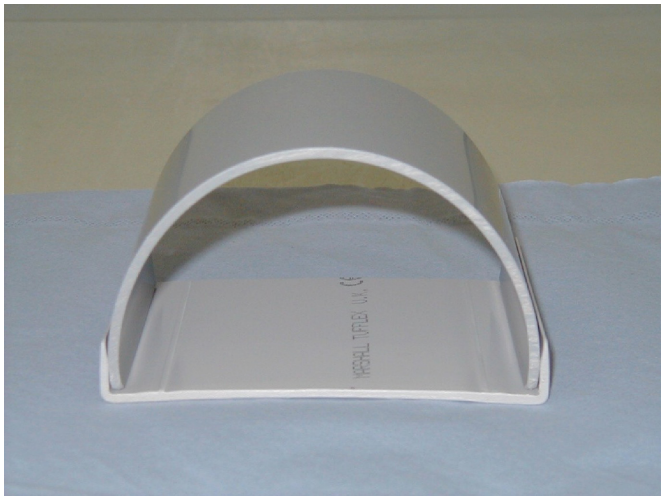
▼**M6**

*Apéndice 4B*

**Sustrato de desove del pez cabeza gorda**

En cada recipiente de ensayo se colocan dos o tres tejas y bandejas de desove combinadas de plástico/cerámica/vidrio o de acero inoxidable (por ejemplo, un canalón semicircular gris de 80 mm de largo colocado sobre una bandeja con borde de 130 mm de largo) (véase la imagen). Ha quedado demostrado que las tejas de PVC o cerámica bien preparadas resultan adecuadas como sustrato de desove (Thorpe *et al.*, 2007).

Se recomienda someter a abrasión las tejas para mejorar la adherencia. La bandeja también debe controlarse para evitar que los peces accedan a los huevos que hayan caído, a menos que la eficiencia de la adherencia de los huevos haya quedado demostrada en el sustrato de desove utilizado.



La base se ha diseñado para contener los huevos que no se adhieran a la superficie de la teja y que, por lo tanto, caigan al fondo del depósito (o los huevos que directamente se coloquen en la base de plástico plana). Todos los sustratos de desove deben lixiviarse durante 12 horas como mínimo, con agua de dilución, antes de usarse.

BIBLIOGRAFÍA

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M6

*Apéndice 5A*

**EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES SEXUALES SECUNDARIOS EN EL PEZ CABEZA GORDA PARA LA DETECCIÓN DE DETERMINADAS SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ENDOCRINA**

**Descripción general**

Entre las características potencialmente importantes del aspecto físico de los peces cabeza gorda adultos en los ensayos sobre alteradores endocrinos se incluyen el color del cuerpo (es decir, claro u oscuro), los modelos de coloración (es decir, la presencia o ausencia de franjas verticales), la forma del cuerpo (es decir, forma de la zona de la cabeza y del pecho, distensión del abdomen) y caracteres sexuales secundarios específicos (es decir, número y tamaño de tubérculos nupciales, tamaño de la almohadilla dorsal y ovipositor).

Los tubérculos nupciales se encuentran en la cabeza (almohadilla dorsal) de los peces cabeza gorda macho con actividad reproductiva y, habitualmente, están dispuestos siguiendo un modelo simétrico bilateral (Jensen *et al.* 2001). Las hembras de control y los machos y hembras juveniles no presentan desarrollo de tubérculos (Jensen *et al.* 2001). Puede haber hasta ocho tubérculos distintos alrededor de los ojos y entre las narinas de los machos. Los tubérculos más abundantes y de mayor tamaño se encuentran en dos líneas paralelas que aparecen justo debajo de las narinas y encima de la boca. Muchos peces tienen grupos de tubérculos debajo de la mandíbula inferior; los que más cerca están de la boca aparecen, en general, en forma de par simple, mientras que los de posición más ventral pueden estar formados hasta por cuatro tubérculos. El número real de tubérculos rara vez supera los 30 (rango, 18-28; Jensen *et al.* 2001). Los tubérculos predominantes (en términos de número) aparecen como una estructura individual y relativamente redonda, con una altura que equivale aproximadamente al radio. Los machos con mayor actividad reproductiva también tienen, al menos algunos, tubérculos que engrosan y protruyen de forma que no pueden diferenciarse como estructuras individuales.

Algunos tipos de sustancias que alteran la actividad endocrina pueden provocar la aparición anómala de determinados caracteres sexuales secundarios en el sexo opuesto; por ejemplo, los agonistas de receptores de andrógenos, como la 17beta-metiltestosterona o la 17beta-trembolona, pueden provocar que los peces cabeza gorda hembra desarrollen tubérculos nupciales (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), mientras que los agonistas de receptores de estrógenos pueden reducir el número o el tamaño de los tubérculos nupciales en los machos (Miles-Richardson *et al.* 1999; Harries *et al.* 2000).

A continuación se presenta una descripción de la caracterización de los tubérculos nupciales en el pez cabeza gorda, con arreglo a los procedimientos utilizados en el laboratorio de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos, ubicado en Duluth, Minnesota. Algunos productos o equipos específicos se pueden sustituir por materiales comparables disponibles.

La mejor visualización se logra con una lupa iluminada o con un microscopio de disección iluminado 3X. Observe los peces en posición dorsal, con la parte anterior hacia delante (con la cabeza orientada hacia el observador).

a) Coloque los peces en una placa de Petri pequeña (por ejemplo, de 100 mm de diámetro), con la parte anterior hacia delante y la ventral hacia abajo. Enfoque el visor para permitir la identificación de los tubérculos. Suave y lentamente, gire los peces de un lado a otro para identificar las zonas de los tubérculos. Cuente y clasifique los tubérculos.

b) Repita esta observación en la superficie ventral de la cabeza colocando el pez sobre la cara dorsal, con la parte anterior hacia delante en la placa de Petri.

c) Las observaciones deben llevarse a cabo en dos minutos con cada pez.

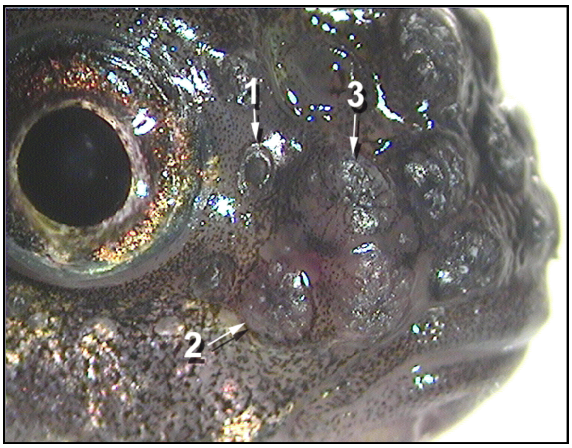
▼M6

**Recuento y clasificación de tubérculos**

Se han determinado seis áreas concretas para evaluar la presencia y el desarrollo de tubérculos en peces cabeza gorda adultos. Se ha elaborado una plantilla para cartografiar la ubicación y la cantidad de los tubérculos presentes (véase el final de este apéndice). Se registra el número de tubérculos y su tamaño puede clasificarse cuantitativamente de la siguiente manera: 0: ausencia; 1: presente; 2: agrandado y 3: pronunciado, para cada organismo (véase la figura 1).

Tipo 0: ausencia de tubérculos. Tipo 1: presente, que se asigna cuando algún tubérculo tiene un solo punto cuya altura sea casi equivalente a su radio (diámetro). Tipo 2: agrandado, que se asigna cuando hay tejido que se parece a un asterisco, habitualmente con una gran base radial con ranuras o surcos que salen del centro. La altura de los tubérculos suele ser más irregular, pero a veces pueden presentar una forma redondeada. Tipo 3: pronunciado; habitualmente son bastante grandes y redondeados con una estructura menos definida. En ocasiones, estos tubérculos se unen y forman una sola masa en torno a una sola área o una combinación de áreas (B, C y D, que se describen a continuación). El color y el diseño son similares a los del tipo 2, pero, en ocasiones, son bastante indiscriminados. Con este sistema de puntuación, el resultado será, en general, una clasificación de tubérculos inferior a 50 en un macho de control normal con un recuento de tubérculos de 18 a 20 (Jensen *et al.* 2001).

*Figura 1*




El número real de tubérculos en algunos peces puede ser superior al de los recuadros de la plantilla (apéndice A) en un área de clasificación determinada. En tal caso, pueden marcarse otros números de clasificación a la derecha o a la izquierda del recuadro. Por lo tanto, no es necesario que la plantilla sea simétrica. Otra técnica para la cartografía de los tubérculos que se emparejan o unen verticalmente a lo largo del plano horizontal de la boca consiste en el doble marcado de dos puntos de clasificación de los tubérculos en un mismo recuadro.

Regiones de cartografía:

A — Tubérculos situados alrededor del ojo. Ubicación dorsal a ventral alrededor del borde anterior del ojo. Habitualmente múltiples en los machos de control maduros, no presentes en las hembras de control y, en general, en parejas (uno cerca de cada ojo) o aislados en las hembras expuestas a andrógenos.

B — Tubérculos situados entre las narinas (poros de los canales sensoriales). Normalmente, en parejas en los machos de control a niveles más altos de desarrollo (2: agrandado o 3: pronunciado). No están presentes en las hembras de control y presentan una cierta incidencia y desarrollo en las hembras expuestas a andrógenos.

C — Tubérculos situados en posición inmediatamente anterior a las narinas en paralelo con la boca. Generalmente agrandados o pronunciados en los machos de control maduros. Presentes o agrandados en los machos menos desarrollados o en las hembras tratadas con andrógenos.

▼**M6**

D — Tubérculos situados en paralelo con la línea de la boca. En general, se clasifican como desarrollados en los machos de control. Ausentes en las hembras de control, pero presentes en las hembras expuestas a andrógenos.

E — Tubérculos situados en la mandíbula inferior, cerca de la boca, por lo general pequeños y habitualmente en parejas. Varían en los machos de control o tratados y en las hembras tratadas.

F — Tubérculos situados en posición ventral con respecto a la región E. Habitualmente son pequeños y aparecen en parejas. Presentes en los machos de control y en las hembras expuestas a andrógenos.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (Pimephales promelas). Environ Toxicol Chem 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environ Toxicol Chem 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA,Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows (Pimephales promelas). Environ Sci Technol 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow (Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. J Fish Biol 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (Pimephales promelas). Aquat Toxicol 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows (Pimephales promelas). Can J Zool 52:1031-1038.

**Plantilla de tubérculos**

**ID** _____

**Fecha** _____

**Puntuación total** _____

**Clasificación numérica**

1: presente

2: agrandado

3: pronunciado

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **A** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | | | | | |
| | **B** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | | | | | |
| | **C** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** |
| | **D** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** |
| | | **E** | **X1** | **X1** | | | | | | |
| | **F** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | | | | | |

▼M6

*Apéndice 5B*

**Evaluación de los caracteres sexuales secundarios en el medaka para la detección de determinadas sustancias con actividad endocrina**

A continuación se presenta una descripción de la medición de los tubérculos papilares (*), que constituyen los caracteres sexuales secundarios del medaka (*Oryzias latipes*).

(*) Los tubérculos papilares aparecen normalmente solo en los machos adultos y se encuentran en los radios de las aletas, del segundo al séptimo u octavo contando desde el extremo posterior de la aleta anal (fig.1 y fig. 2). Sin embargo, en raras ocasiones aparecen tubérculos en el primer radio de la aleta, contando desde el extremo posterior de la aleta anal. Este procedimiento normalizado de trabajo (PNT) abarca la medición de los tubérculos en el primer radio de la aleta (en este PNT el número de radio de la aleta hace referencia al orden desde el extremo posterior de la aleta anal).

1) Tras la extirpación del hígado (apéndice 6), el cadáver se coloca en un tubo cónico que contiene aproximadamente 10 ml de formol tamponado neutro al 10 % (arriba la cabeza y abajo la cola). Si la gónada se fija con una solución distinta al formol tamponado neutro al 10 %, con una cuchilla realice un corte transversal en el cadáver entre la región anterior de la aleta anal y el ano, con cuidado de no dañar el gonoporo y la propia gónada (fig. 3). Coloque la parte craneal del cuerpo del pez en la solución de fijación para conservar la gónada y la parte caudal del cuerpo del pez en el formol tamponado neutro al 10 %, tal y como se ha descrito anteriormente.

2) Tras colocar el cuerpo del pez en formol tamponado neutro al 10 %, sujete la región anterior de la aleta anal con unas pinzas y dóblela durante unos 30 segundos para mantener abierta la aleta anal. Al sujetar la aleta anal con las pinzas, agarre varios radios de la aleta de la región anterior, con cuidado de no provocar arañazos en los tubérculos papilares.

3) Tras mantener abierta la aleta anal durante 30 segundos aproximadamente, conserve el cuerpo del pez en formol tamponado neutro al 10 % a temperatura ambiente hasta que se lleve a cabo la medición de los tubérculos papilares (la medición debe realizarse cuando hayan trascurrido como mínimo 24 horas desde la fijación).

**Medición**

1) Tras fijar el cuerpo del pez en formol tamponado neutro al 10 % durante 24 horas como mínimo, tome el cadáver del pez del tubo cónico y retire el formol con un papel de filtro (o una servilleta de papel).

2) Coloque el pez con el abdomen orientado hacia arriba. A continuación, corte con cuidado la aleta anal con unas tijeras pequeñas de disección (es preferible cortar la aleta anal con una pequeña cantidad de pterigióforo).

3) Tome la región anterior de la aleta anal cortada con ayuda de unas pinzas y colóquela en un portaobjetos de vidrio con unas cuantas gotas de agua. A continuación, cubra la aleta anal con un cubreobjetos de vidrio. Asegúrese de no provocar arañazos en los tubérculos papilares al agarrar la aleta anal con las pinzas.

4) Cuente el número de segmentos de los radios con tubérculos papilares con ayuda del contador en un microscopio biológico (microscopio vertical o invertido). Los tubérculos papilares se reconocen cuando se puede ver una pequeña formación de procesos en el margen posterior del segmento.

▼**M6**

Anote en la hoja de cálculo el número de segmentos con tubérculos papilares en cada radio de la aleta (por ejemplo, primer radio de la aleta: 0; segundo radio de la aleta: 10; tercer radio de la aleta: 12, etc.), e introduzca en la hoja de cálculo de Excel la suma de estas cantidades para cada pez. En caso necesario, haga una fotografía de la aleta anal y cuente el número de segmentos con tubérculos papilares que aparecen en la fotografía.

5) Después de la medición, coloque la aleta anal en el tubo cónico que se describe en el punto 1 y consérvela.

*Fig. 1.*

**Diagrama que muestra las diferencias sexuales en la forma y el tamaño de la aleta anal. A: macho; B: hembra. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Universidad de Tokio, IV, 2: 209-218.**

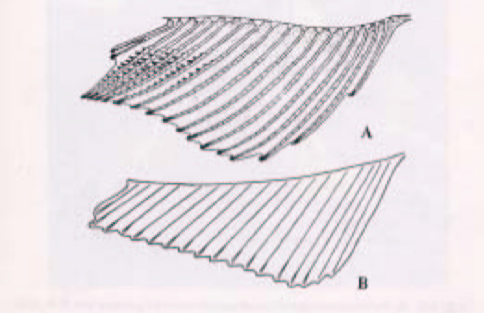
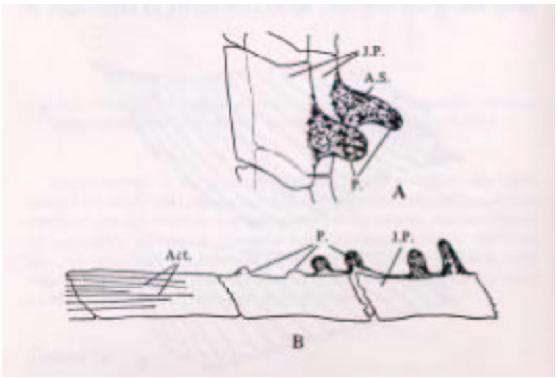



*Fig. 2.*

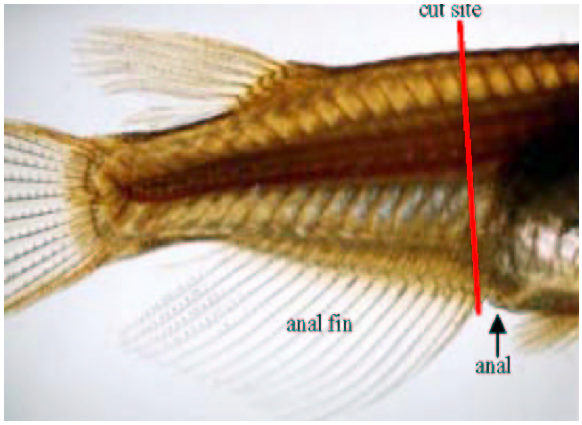
**A: Tubérculos en los segmentos de unión del radio de la aleta anal. J.P.: segmento: A.S.: espacio axial; P.: tubérculo. B: extremidad distal del radio de la aleta. En el extremo hay actinotricos. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of Oryzias latipes and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Universidad de Tokio, IV, 2: 209-218.**



▼M6

*Fig. 3.*

**Fotografía del cuerpo de un pez que muestra el lugar del corte cuando la gónada se fija con una solución de fijación distinta al formol tamponado neutro al 10 %. En ese caso, el resto del cuerpo se cortará entre la región anterior de la aleta anal y la región anal con una cuchilla (línea roja) y la parte de la cabeza del cuerpo del pez se introducirá en la solución de fijación para la gónada y la parte de la cola del cuerpo del pez se introducirá en el formol tamponado neutro al 10 %.**



▼M6

*Apéndice 6*

**Procedimientos recomendados para la recogida de muestras para el análisis de vitelogenina**

Se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada entre las muestras de VTG de machos y hembras.

**Procedimiento 1A: Pez cabeza gorda, extracción de sangre de la vena o la arteria caudal**

Tras anestesiar, el pedúnculo caudal se corta parcialmente con una hoja de bisturí y se extrae sangre de la vena o la arteria caudal con un tubo capilar para microhematocrito heparinizado. Una vez recogida la sangre, el plasma se aísla rápidamente mediante centrifugado durante 3 minutos a 15 000 *g* (o, de manera alternativa, durante 10 minutos a 15 000 g a 4 °C). Si se desea, se puede determinar el porcentual hematocrito después del centrifugado. A continuación, se retira la parte de plasma del tubo para microhematocrito y se conserva en un tubo de centrífuga con 0,13 unidades de aprotinina (inhibidor de la proteasa) a – 80 °C hasta que pueda determinarse la vitelogenina. Según el tamaño del pez cabeza gorda (en función del sexo), los volúmenes de plasma que se pueden recoger oscilan, en general, entre 5 y 60 microlitros por pez (Jensen *et al.* 2001).

**Procedimiento 1B: Pez cabeza gorda, extracción de sangre del corazón**

También se puede recoger sangre mediante punción cardíaca mediante una jeringa heparinizada (1 000 unidades de heparina por ml). La sangre se transfiere a tubos Eppendorf (que se han mantenido en hielo) y, a continuación, se centrifugan (5 min, 7 000 g, a temperatura ambiente). El plasma debe transferirse a tubos Eppendorf limpios (en partes alícuotas si el volumen del plasma lo permite) y congelarse de inmediato a – 80 °C hasta que se analice (Panter *et al.,* 1998).

**Procedimiento 2A: Medaka, extirpación del hígado del medaka**

Extraiga los peces del ensayo del recipiente de ensayo.

1) Los peces del ensayo deben extraerse del recipiente de ensayo con la red cuchara pequeña. Tenga cuidado de no dejar caer los peces del ensayo en otros recipientes.

2) En principio, los peces del ensayo deben extraerse en el orden siguiente: control, control de disolvente (si procede), concentración más baja, concentración media, concentración más alta y control positivo. Además, deben extraerse todos los machos de una cámara de ensayo antes de extraer el resto de hembras.

3) El sexo de cada uno de los peces del ensayo se determina con arreglo a los caracteres sexuales secundarios externos (por ejemplo, la forma de la aleta anal).

4) Coloque los peces del ensayo en un recipiente de transporte y llévelo al puesto de trabajo para proceder a la extirpación del hígado. Verifique que las etiquetas del recipiente de ensayo y del recipiente de transporte sean correctas y para confirmar que el número de peces extraídos del recipiente de ensayo y el número de peces que quedan en dicho recipiente coincidan con los números previstos.

5) Si no se pudiera determinar el sexo mediante el aspecto externo de los peces, extraiga todos los peces de la cámara de ensayo. En ese caso, el sexo deberá determinarse mediante la observación de la gónada o de los caracteres sexuales secundarios con un microscopio estereoscópico.

▼**M6**

Extirpación del hígado

1) Transfiera el pez del ensayo desde el recipiente de transporte a la solución anestésica con la red cuchara pequeña.

2) Una vez anestesiado, transfiera el pez del ensayo al papel de filtro (o una servilleta de papel) con unas pinzas (de tipo normal). Al agarrar el pez del ensayo, coloque las pinzas a los lados de la cabeza para evitar que se rompa la cola.

3) Retire el agua de la superficie del pez del ensayo con el papel de filtro (o la servilleta de papel).

4) Coloque el pez con el abdomen orientado hacia arriba. A continuación, realice una pequeña incisión transversal a medio camino entre la región ventral del cuello y la región media del abdomen con ayuda de unas tijeras de disección.

5) Introduzca las tijeras de disección en la pequeña incisión y realice una incisión en el abdomen desde un punto posterior a la cavidad branquial hasta la cara interior del ano y a lo largo de la línea media del abdomen. Tenga cuidado de no introducir las tijeras de disección a demasiada profundidad para evitar daños en el hígado y la gónada.

6) Realice las siguientes operaciones con un microscopio estereoscópico.

7) Coloque el pez del ensayo con el abdomen orientado hacia arriba sobre la servilleta de papel (también se pueden utilizar placas de Petri o portaobjetos de vidrio).

8) Extienda las paredes de la cavidad abdominal con unas pinzas de precisión hasta que se expongan los órganos internos. Si es necesario, también se pueden exponer los órganos internos retirando un lado de la pared de la cavidad abdominal.

9) Exponga la parte unida del hígado y de la vesícula biliar con otras pinzas de precisión. A continuación, sujete el conducto biliar y desprenda la vesícula con un corte. Tenga cuidado para no romper la vesícula.

10) Sujete el esófago y separe el tubo gastrointestinal del hígado de la misma manera. Tenga cuidado para que no se salga el contenido del tubo gastrointestinal. Separe el tracto gastrointestinal caudal del ano y extraiga el tubo de la cavidad abdominal.

11) Recorte la masa de grasa y otros tejidos del entorno del hígado. Tenga cuidado de no arañar el hígado.

12) Sujete el área del hilio hepático con las pinzas de precisión y extraiga el hígado de la cavidad abdominal.

13) Coloque el hígado en el portaobjetos de vidrio. Con ayuda de las pinzas de precisión, retire los eventuales restos de grasa y tejidos externos (por ejemplo, la mucosa abdominal) de la superficie del hígado, si fuera necesario.

14) Mida el peso del hígado con un microtubo de 1,5 ml como tara con una balanza analítica electrónica. Registre el valor en la hoja de cálculo (precisión de: 0,1 mg). Confirme la información de identificación de la etiqueta del microtubo.

15) Cierre el tapón del microtubo que contiene el hígado. Guárdelo en una gradilla de refrigeración (o una gradilla con hielo).

16) Tras extirpar un hígado, limpie los instrumentos de disección o sustitúyalos por otros que estén limpios.

▼M6

17) Extirpe los hígados de todos los peces del recipiente de transporte, tal y como se ha descrito anteriormente.

18) Una vez que se haya extirpado el hígado de todos los peces del contenedor de transporte (es decir, todos los machos o las hembras de un recipiente de ensayo), coloque todas las muestras de hígado en una gradilla para tubos con una etiqueta de identificación y guárdelas en un congelador. Cuando los hígados se vayan a someter a un pretratamiento poco después de la extirpación, las muestras se llevan al puesto de trabajo más próximo en una gradilla de refrigeración (o una gradilla con hielo).

Tras la extirpación del hígado, el cadáver del pez puede utilizarse para medir los caracteres sexuales secundarios.

Muestra

Guarde las muestras hepáticas recogidas de los peces del ensayo a ≤ – 70 °C si no van a utilizarse en un pretratamiento poco después de la extirpación.

*Fig. 1*

**Se hace una incisión con unas tijeras justo en la zona anterior a las aletas pectorales.**

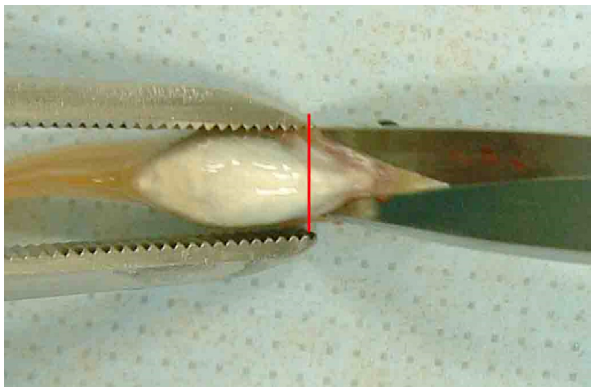
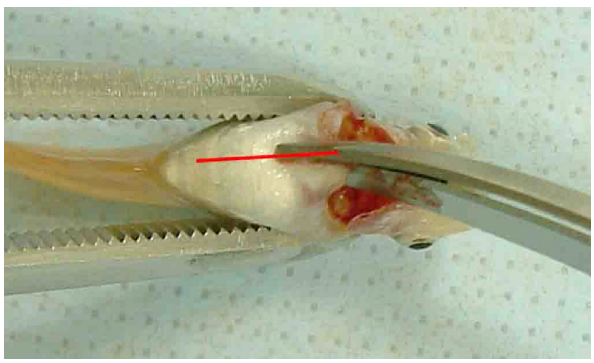


*Fig. 2*

**Se realiza una incisión en la línea media del abdomen con las tijeras hasta un punto aproximadamente 2 mm anterior al ano.**



▼M6

*Fig. 3*

**Las paredes abdominales se extienden con unas pinzas para exponer el hígado y otros órganos internos. (Otra posibilidad es sujetar lateralmente las paredes abdominales).**

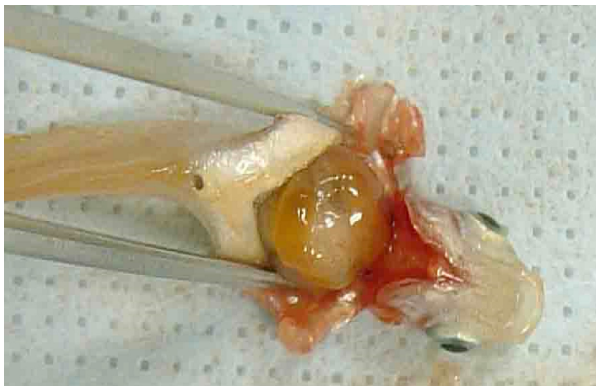


*Fig. 4*

**El hígado se somete a disección roma y se extirpa con pinzas.**

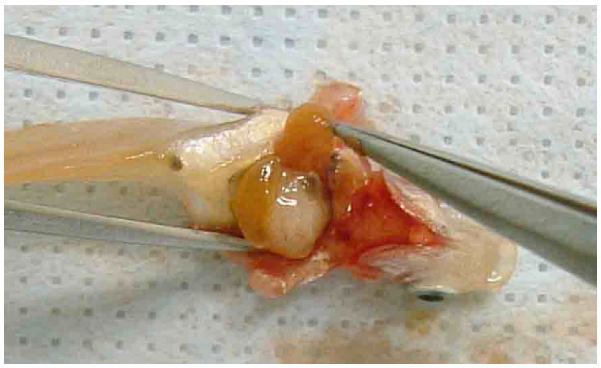


*Fig. 5*

**Se tira levemente con fórceps de los intestinos.**



▼M6

*Fig. 6*

**Los dos extremos de los intestinos y los eventuales elementos mesentéricos se cortan con unas tijeras.**

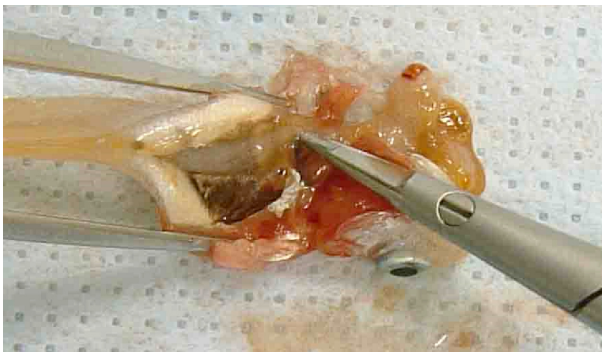


*Fig. 7 (hembra)*

**El procedimiento es idéntico con la hembra.**

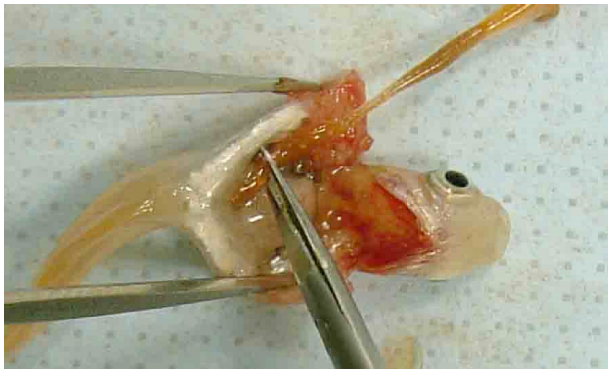
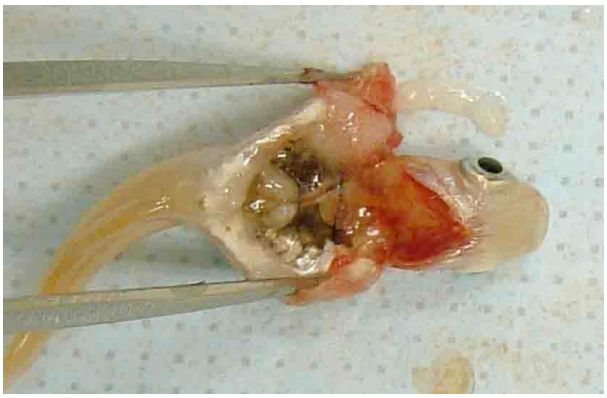


*Fig. 8*

**El procedimiento una vez finalizado.**



**Procedimiento 2 B: Medaka (Oryzias latipes), pretratamiento del hígado para el análisis de la vitelogenina.**

Tome el frasco de tampón de homogeneización del juego ELISA y enfríelo con hielo picado (temperatura de la solución: ≤ 4 °C). Si se utiliza el tampón de homogeneización del sistema ELISA EnBio, descongele la solución a temperatura ambiente y, a continuación, enfríe el frasco con hielo picado.

▼**M6**

Calcule el volumen del tampón de homogeneización para el hígado con arreglo a su peso (añada 50 µl de tampón de homogeneización por cada mg de peso del hígado para su homogeneización). Por ejemplo, si el hígado pesa 4,5 mg, el volumen de tampón de homogeneización para el hígado será de 225 µl. Prepare una lista de volúmenes de tampón de homogeneización para todos los hígados.

Preparación del hígado para el pretratamiento

1) Justo antes del pretratamiento, saque del congelador el microtubo de 1,5 ml que contiene el hígado.

2) El pretratamiento del hígado de los machos debe realizarse antes del de las hembras para evitar la contaminación con vitelogenina. Además, el pretratamiento de los grupos del ensayo debe realizarse en el orden siguiente: control, control de disolvente (si procede), concentración más baja, concentración media, concentración más alta y control positivo.

3) El número de microtubos de 1,5 ml que contienen muestras de hígado y que se extraen del congelador en un momento determinado no debe superar al número de microtubos que se puedan centrifugar en ese momento.

4) Disponga los microtubos de 1,5 ml con las muestras hepáticas siguiendo el orden del número de muestra de la gradilla con hielo (no es necesario descongelar el hígado).

Realización del pretratamiento

1. Adición del tampón de homogeneizado

   1) Compruebe en la lista el volumen del tampón de homogeneización que debe utilizarse para una muestra concreta de hígado y ajuste la micropipeta (intervalo de volumen: 100 - 1 000 µl) al volumen correspondiente. Coloque una punta limpia en la micropipeta.

   2) Tome el tampón de homogeneización del frasco de reactivo y añada el tampón al microtubo de 1,5 ml que contiene el hígado.

   3) Añada el tampón de homogeneización a todos los microtubos de 1,5 ml que contienen el hígado siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. No es necesario cambiar la punta de la micropipeta por una nueva. No obstante, si la punta se contamina o se cree que puede estar contaminada, debe reemplazarse.

2. Homogeneización del hígado

   1) Conecte una nueva mano de mortero de homogeneización al homogeneizador de microtubos.

   2) Introduzca la mano de mortero en el microtubo de 1,5 ml. Sujete el homogeneizador de microtubos para comprimir el hígado entre la superfície de la mano de mortero y la pared interior del microtubo de 1,5 ml.

   3) Ponga en marcha el homogeneizador de microtubos entre 10 y 20 segundos. Enfríe el microtubo de 1,5 ml con hielo picado durante la operación.

   4) Levante la mano de mortero del microtubo de 1,5 ml y déjelo en reposo durante unos 10 segundos. A continuación, realice una comprobación visual del estado de la suspensión.

   5) Si se observan trozos de hígado en la suspensión, repita las operaciones 3 y 4 para preparar de forma satisfactoria el homogeneizado de hígado.

▼**M6**

6) Enfríe el homogeneizado de hígado suspendido en la gradilla con hielo hasta su centrifugado.

7) Cambie la mano de mortero por una nueva para cada homogeneizado.

8) Realice el homogeneizado de todos los hígados con el tampón de homogeneización de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

3. Centrifugado del homogeneizado de hígado suspendido

1) Confirme que la temperatura de la cámara de centrifugado refrigerada es ≤ 5 °C.

2) Inserte los microtubos de 1,5 ml que contienen el homogeneizado de hígado suspendido en una centrífuga refrigerada (en caso necesario, ajuste el equilibrio).

3) Centrifugue el homogeneizado de hígado suspendido a 13 000 *g* durante 10 minutos a ≤ 5 °C. No obstante, si los sobrenadantes se separan correctamente, el tiempo y la fuerza centrífuga podrán ajustarse según resulte necesario.

4) Tras el centrifugado, verifique que los sobrenadantes estén debidamente separados (superficie: lípidos; capa intermedia: sobrenadantes; capa inferior: tejido hepático). Si la separación no es correcta, centrifugue de nuevo la suspensión en las mismas condiciones.

5) Retire todas las muestras de la centrífuga refrigerada y dispóngalas siguiendo el orden de número de muestra en la gradilla con hielo. Tenga cuidado de no volver a suspender cada capa separada después del centrifugado.

4. Recogida de los sobrenadantes

1) Coloque cuatro microtubos de 0,5 ml para el almacenamiento del sobrenadante en la gradilla de tubos.

2) Aspire 30 µl de cada sobrenadante (separado en forma de capa intermedia) con la micropipeta y páselos a un microtubo de 0,5 ml. Tenga cuidado de no aspirar los lípidos de la superficie ni el tejido hepático de la capa inferior.

3) Aspire el sobrenadante y páselo a dos microtubos más de 0,5 ml de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

4) Aspire el resto del sobrenadante con la micropipeta (si es posible: ≥ 100 µl). A continuación, pase el sobrenadante al microtubo de 0,5 ml restante. Tenga cuidado de no aspirar los lípidos de la superficie ni el tejido hepático de la capa inferior.

5) Cierre el tapón del microtubo de 0,5 ml y anote el volumen de sobrenadante en la etiqueta. A continuación, enfríe inmediatamente los microtubos en la gradilla con hielo.

6) Cambie la punta de la micropipeta por una nueva para cada sobrenadante. Si se adhiere a la punta una gran cantidad de lípidos, cámbiela inmediatamente por una nueva para evitar la contaminación del extracto de hígado con grasa.

7) Pase todo el sobrenadante centrifugado a cuatro microtubos de 0,5 ml de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

▼M6

8) Tras pasar el sobrenadante a los microtubos de 0,5 ml, colóquelos en la gradilla de tubos con su etiqueta de identificación y, a continuación, colóquelos inmediatamente en el congelador. Si las concentraciones de VTG se miden inmediatamente después del pretratamiento, mantenga refrigerado un microtubo de 0,5 ml (con 30 µl de sobrenadante) en la gradilla de tubos y transfiérala al puesto de trabajo en el que vaya a realizarse la prueba ELISA. En ese caso, coloque el resto de microtubos en las gradillas de tubos e introdúzcalas en el congelador.

9) Tras recoger el sobrenadante, elimine el residuo de forma adecuada.

*Almacenamiento de la muestra*

Almacene los microtubos de 0,5 ml que contengan el sobrenadante del homogeneizado de hígado a ≤ – 70 °C hasta que se vayan a utilizar en la prueba ELISA.

**Procedimiento 3A: Pez cebra, extracción de sangre de la vena o de la arteria caudal**

Tras anestesiar, el pedúnculo caudal se corta transversalmente y se extrae sangre de la arteria o de la vena caudal con un tubo capilar para microhematocrito heparinizado. El volumen de sangre varía entre 5 y 15 µl según el tamaño del pez. Se añade al tubo microcapilar un volumen igual de tampón de aprotinina (6 µgml en PBS) y el plasma se separa de la sangre por centrifugado (5 minutos a 600 g). El plasma se recoge en los tubos de ensayo y se conserva a – 20 °C hasta que se analice para determinar la vitelogenina u otras proteínas de interés.

**Procedimiento 3B: Pez cebra, extracción de sangre por punción cardíaca**

Para evitar la coagulación de la sangre y el deterioro de la proteína, las muestras se recogen en un tampón con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene heparina (1 000 unidades/ml) y aprotinina inhibidora de la proteasa (2 TIU/ml). Se recomiendan la la sal amónica de la heparina y la aprotinina liofilizada como ingredientes del tampón. Para la recogida de las muestras de sangre se recomienda usar una jeringa (1 ml) con una aguja fina fija (por ejemplo, Braun Omnikan-F). La jeringa debe llenarse previamente con el tampón (aproximadamente 100 µl) para eluir completamente los pequeños volúmenes de sangre de cada pez. Las muestras de sangre se toman mediante punción cardíaca. En un primer momento, el pez debe anestesiarse con MS-222 (100 mg/l). El plano anestésico adecuado permite al usuario distinguir el latido del pez cebra. Mientras puncione el corazón, mantenga una ligera presión en el pistón de la jeringa. Los volúmenes de sangre que pueden extraerse oscilan entre los 20 y los 40 microlitros. Tras la punción cardíaca, la mezcla de tampón y sangre debe pasarse al tubo de ensayo. El plasma se separa de la sangre por centrifugado (20 min; 5 000 g) y debe conservarse a – 80 °C hasta que se necesite para realizar el análisis.

**Procedimiento 3C: PNT: Pez cebra, homogeneización de la cabeza y la cola**

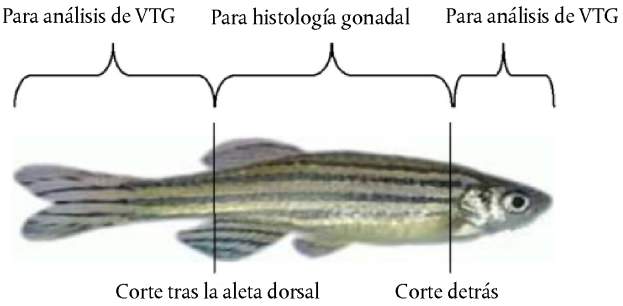
1) Los peces son anestesiados y sacrificados de conformidad con la descripción del ensayo.

2) La cabeza y la cola se separan del cuerpo mediante sendos cortes de acuerdo con la figura 1.

Importante: Todos los instrumentos de disección y la tabla de corte deben enjuagarse y limpiarse a fondo (por ejemplo, con etanol al 96 %) entre cada uno de los peces para evitar que haya «contaminación con vitelogenina» de las hembras o entre los machos inducidos y los machos no inducidos.

▼**M6**

*Figura 1*




3) El peso de la cabeza y la cola juntas de cada pez se mide con precisión de un mg.

4) Tras el pesaje, las partes se colocan en tubos adecuados (por ejemplo, Eppendorf de 1,5 ml) y se congelan a – 80 C hasta que se realice la homogeneización o se homogeneizan directamente con hielo con dos manos de mortero de plástico. (Se pueden utilizar otros métodos si estos se llevan a cabo con hielo y el resultado es una masa homogénea.) Importante: Los tubos deben numerarse correctamente de modo que la cabeza y la cola de los peces puedan correlacionarse con la parte correspondiente del cuerpo que se haya utilizado para la histología gonadal.

5) Cuando se logra obtener una masa homogénea, se añade el tampón de homogenización (*) enfriado con hielo, con un peso que sea cuatro veces el peso del tejido. Siga trabajando con las manos de mortero hasta que la mezcla sea homogénea. Nota importante: Se utilizan manos de mortero nuevas para cada pez.

6) Las muestras se colocan en hielo hasta que se realiza el centrifugado a 4 °C y a 50 000 g durante 30 minutos.

7) Utilice una pipeta para pasar porciones de 20 µl de sobrenadante a dos tubos como mínimo, sumergiendo la punta de la pipeta por debajo de la capa de grasa de la superficie y, con cuidado, succionando el sobrenadante sin partículas de grasa ni de precipitado.

8) Los tubos se conservan a – 80 °C hasta que se utilicen.

---

(*) **Tampón de homogeneización:**

— (Tris-HCl 50 mM pH 7,4; mezcla inhibidora de la proteasa al 1 % (Sigma)]: 12 ml de Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl de mezcla inhibidora de la proteasa.

— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN); por ejemplo, de Bie & Berntsen, Dinamarca.

— Mezcla inhibidora de la proteasa: de Sigma (para tejidos de mamíferos), número de referencia P 8340.

— *Nota:* El tampón de homogeneización debe utilizarse el mismo día que se elabore. Colóquelo en hielo durante su uso.

▼**M6**

*Apéndice 7*

**Muestras de enriquecimiento de la vitelogenina y patrón de referencia interensayos**

Cada día que se realicen ensayos de vitelogenina, se analizará una muestra de enriquecimiento preparada mediante un patrón de referencia interensayos. La vitelogenina utilizada para realizar el patrón de referencia interensayos procederá de un lote distinto del usado para preparar los patrones de calibración del ensayo que se esté llevando a cabo.

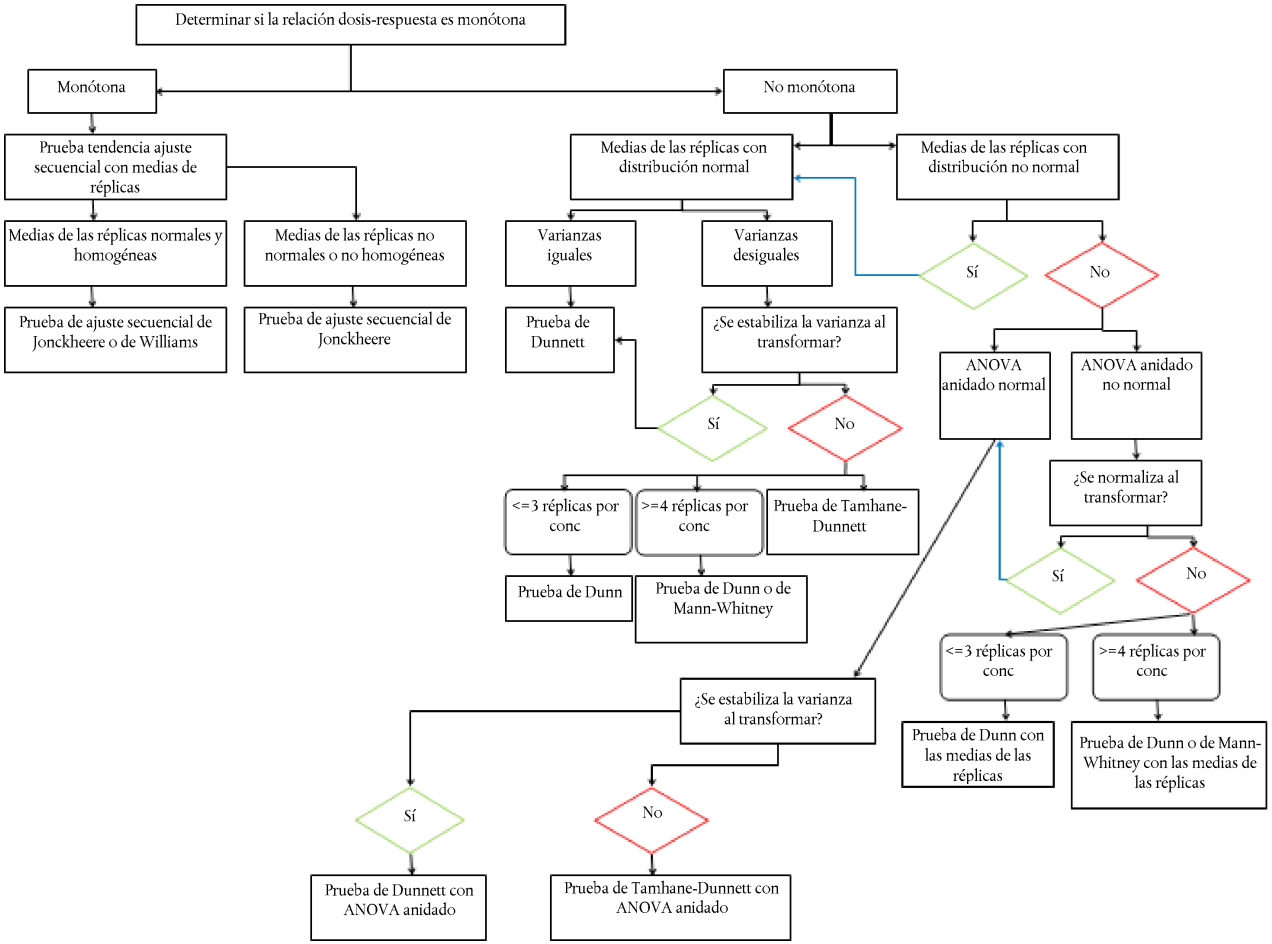
La muestra de enriquecimiento se elaborará añadiendo una cantidad conocida del patrón interensayos a una muestra de plasma de los machos de control. La muestra se enriquecerá para lograr una concentración de vitelogenina entre 10 y 100 veces la concentración de vitelogenina esperada en los peces macho de control. La muestra de plasma de machos de control que se enriquece puede provenir de un solo pez o puede ser un compuesto procedente de varios peces.

Se analizará una submuestra del plasma de los machos de control no enriquecido en, como mínimo, dos pocillos duplicados. La muestra enriquecida también se analizará en, como mínimo, dos pocillos duplicados. La cantidad media de vitelogenina de las dos muestras no enriquecidas de plasma de los machos de control se añadirá a la cantidad calculada de vitelogenina que se haya añadido para enriquecer las muestras a fin de determinar la concentración prevista. La relación entre esta concentración prevista y la concentración medida se indicará junto con los resultados de cada conjunto de ensayos que se hayan realizado ese día.

▼M6

*Apéndice 8*

**Diagrama de flujo para tomar decisiones para el análisis estadístico**




02008R0440 — ES — 16.10.2019 — 008.001 — 2200

▼M6

## C.38. ENSAYO SOBRE METAMORFOSIS DE ANFIBIOS

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 231 de la OCDE (2009). La necesidad de desarrollar y validar un ensayo capaz de detectar determinadas sustancias activas en el sistema tiroideo de las especies de vertebrados radica en la preocupación por que los niveles de sustancias en el medio ambiente puedan provocar efectos adversos tanto en los seres humanos como en la vida silvestre. En 1998, la OCDE promovió una actuación de alta prioridad orientada a revisar las directrices existentes y desarrollar otras nuevas para la selección y evaluación de los alteradores endocrinos potenciales. Una faceta de esta actuación consistió en elaborar las directrices del ensayo para el cribado de las sustancias activas en el sistema tiroideo de las especies de vertebrados. Se propuso una mejora en el estudio Toxicidad oral por administración continuada (28 días) en roedores (capítulo B.7 del presente anexo) y el Ensayo sobre metamorfosis de anfibios (AMA). El método de ensayo mejorado B.7 se sometió a una validación y se ha publicado un método de ensayo revisado. El Ensayo sobre metamorfosis de anfibios (AMA) se sometió a un exhaustivo programa de validación que incluye estudios intralaboratorios e interlaboratorios que demuestran la relevancia y la fiabilidad del ensayo (1, 2). Posteriormente, la validación del ensayo fue objeto de revisión por parte de un grupo de expertos independientes (3). Este método de ensayo es el resultado de la experiencia adquirida durante los estudios de validación para la detección de sustancias con actividad tiroidea, así como de trabajos realizados en otros países miembros de la OCDE.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

2. El Ensayo sobre metamorfosis de anfibios (AMA) es un ensayo de cribado concebido para identificar empíricamente las sustancias que pueden interferir con el funcionamiento normal del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HPT). El AMA representa un modelo de vertebrado generalizado en la medida en que se basa en las estructuras y las funciones conservadas del eje HPT. Se trata de un ensayo importante porque la metamorfosis de los anfibios constituye un proceso dependiente de la tiroides que se ha estudiado en profundidad y que responde a las sustancias con actividad dentro del eje HPT, además de ser el único ensayo que detecta la actividad de la tiroides en un animal en proceso de desarrollo morfológico.

3. El diseño experimental general implica exponer renacuajos de *Xenopus laevis* que se encuentran en la fase 51 a tres concentraciones distintas, como mínimo, de una sustancia problema y a un control con agua de dilución durante 21 días. Hay cuatro réplicas de cada tratamiento del ensayo. La densidad larval al comienzo del ensayo es de veinte renacuajos por recipiente de ensayo en todos los grupos de tratamiento. Los parámetros de observación son la longitud de las extremidades posteriores (HLL, por sus siglas en inglés), la distancia entre el hocico y la abertura cloacal (SVL, por sus siglas en inglés), la fase de desarrollo, el peso húmedo, la histología tiroidea y las observaciones diarias de mortalidad.

### DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Especies de ensayo**

4. La especie *Xenopus laevis* se cría habitualmente en laboratorios de todo el mundo y es fácil de obtener a través de proveedores comerciales. En esta especie se puede inducir fácilmente la reproducción durante todo el año mediante inyecciones de gonadotrofina coriónica humana (hCG) y las larvas resultantes se pueden criar habitualmente hasta las fases de desarrollo

▼M6

deseadas en grandes cantidades para permitir su uso en protocolos de ensayo en fases concretas. Es preferible que las larvas utilizadas en el ensayo se deriven de adultos criados internamente. Como alternativa, aunque no es el procedimiento preferido, se pueden enviar los huevos o los embriones al laboratorio que realiza el ensayo para la aclimatación de los mismos. No se aceptará el envío de ejemplares en fases larvarias para su uso en el ensayo.

**Equipo y suministros**

5. Los siguientes equipos y suministros son necesarios para llevar a cabo este ensayo:

a) sistema de exposición (véase la descripción que aparece más adelante);

b) acuarios de vidrio o de acero inoxidable (véase la descripción que aparece más adelante);

c) recipientes de cría;

d) aparatos de control de temperatura (por ejemplo, calefactores o enfriadores, ajustables a 22 ± 1 °C);

e) termómetro;

f) microscopio de disección binocular;

g) cámara digital con un mínimo de 4 megapíxeles de resolución y apta para su uso en microscopía;

h) programas informáticos de digitalización de imágenes;

i) placa de Petri (por ejemplo, de 100 × 15 mm) o cámara de plástico transparente de un tamaño equivalente;

j) balanza analítica con precisión de tres decimales (mg);

k) aparato de medición de oxígeno disuelto;

l) pH-metro;

m) medidor de la intensidad de la luz que pueda medir en unidades lux;

n) diversas herramientas e instrumental de vidrio de laboratorio;

o) pipetas ajustables (de 10 a 5 000 µl) o un surtido de pipetas de tamaños equivalentes;

p) sustancia problema en cantidades suficientes para llevar a cabo el estudio, preferiblemente de un mismo lote; e

q) instrumentación analítica adecuada para la sustancia problema o servicios analíticos contratados.

**Posibilidad de someter a ensayo la sustancia**

6. El AMA se basa en un protocolo de exposición acuosa por el cual se introduce la sustancia problema en las cámaras del ensayo a través de un sistema dinámico. Sin embargo, los métodos dinámicos conllevan restricciones sobre los tipos de sustancias que pueden someterse a ensayo según las propiedades fisicoquímicas de la sustancia en sí. Por lo tanto, antes de utilizar este protocolo, debe obtenerse información básica sobre la sustancia que sea pertinente para determinar la posibilidad de someterla a ensayo, y

▼M6

debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas dificultosas (4). Entre las características que indican que la sustancia puede resultar difícil de someter a ensayo en sistemas acuáticos se incluyen las siguientes: coeficientes altos de reparto octanol/agua (log $K_{ow}$), alta volatilidad, susceptibilidad a la hidrólisis y susceptibilidad a la fotólisis en condiciones de iluminación ambiente de laboratorio. Hay otros factores que también pueden resultar significativos a la hora de determinar la posibilidad de someter la sustancia a ensayo y que deben determinarse caso por caso. Si no se consigue realizar correctamente un ensayo con una sustancia utilizando un sistema de flujo dinámico, podrá emplearse un sistema de renovación estática. Si ninguno de los dos sistemas es capaz de admitir la sustancia problema, la opción predeterminada es no ensayarla utilizando este protocolo.

**Sistema de exposición**

7. Cuando sea posible, se prefiere un sistema de diluyente dinámico a un sistema de renovación estática. Si las propiedades físicas o químicas de cualquiera de las sustancias problema no favorecen el uso de un sistema de diluyente dinámico, puede utilizarse otro sistema de exposición (por ejemplo, renovación estática). Los componentes del sistema en contacto con el agua deben ser de vidrio, acero inoxidable o politetrafluoroetileno. Sin embargo, se pueden utilizar plásticos adecuados que no comprometan el estudio. Los recipientes de exposición deben ser acuarios de vidrio o acero inoxidable, equipados de tuberías, con un volumen del recipiente aproximado entre los 4,0 y los 10,0 l, y una profundidad mínima del agua que oscile entre los 10 y los 15 cm. El sistema debe ser capaz de acoger todas las concentraciones de exposición y un control, con cuatro réplicas por tratamiento. El caudal de cada recipiente debe ser constante y tener en cuenta tanto el mantenimiento de las condiciones biológicas como la exposición a la sustancia (por ejemplo, 25 ml/min). Los recipientes de tratamiento deben asignarse aleatoriamente a una posición del sistema de exposición para reducir los posibles efectos posicionales, incluyendo ligeras variaciones de temperatura, intensidad de la luz, etc. Debe utilizarse iluminación fluorescente para proporcionar un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con una intensidad que varíe entre 600 y 2 000 lux (lumen/$m^2$) en la superficie del agua. La temperatura del agua debe mantenerse a 22 ± 1 °C, el pH debe mantenerse entre 6,5 y 8,5, y la concentración de oxígeno disuelto (OD) debe ser superior a 3,5 mg/l (> 40 % de la saturación de aire) en cada recipiente del ensayo. La temperatura del agua, el pH y el oxígeno disuelto deben medirse cada semana como mínimo; preferiblemente, la temperatura debe medirse de manera continua al menos en un recipiente del ensayo. En el apéndice 1 figuran las condiciones experimentales en las que debe ejecutarse el protocolo. Para obtener más información sobre la configuración de sistemas de exposición dinámica o de sistemas de renovación estática, consulte la ASTM *Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians* (5), así como pruebas generales de toxicología acuática.

*Calidad del agua*

8. Puede utilizarse cualquier agua que esté disponible localmente (por ejemplo, agua de manantial o agua del grifo pasada por filtro de carbón) y permita el crecimiento y el desarrollo normales de renacuajos de *X. laevis*. Como la calidad del agua local puede variar considerablemente de una zona a otra, debe analizarse, en particular si no hay disponibles datos históricos sobre la adecuación del agua para criar *Xenopus*. Debe prestarse una atención especial a que el agua esté libre de cobre, cloro y cloraminas, ya que todas estas sustancias son tóxicas para las ranas y los renacuajos. Asimismo, se recomienda analizar el agua en lo que respecta a los niveles de

▼M6

fondo de fluoruro, perclorato y clorato (subproductos de la desinfección del agua potable), ya que todos estos aniones son sustratos del transportador de yodo de la glándula tiroidea y unos niveles altos de cada uno de estos aniones pueden alterar el resultado del estudio. El análisis debe realizarse antes de que se inicien las pruebas y, normalmente, el agua del ensayo debe estar libre de estos aniones.

*Concentración de yodo en el agua del ensayo*

9. A fin de que la glándula tiroidea sintetice la HT, debe haber suficiente yoduro disponible para las larvas mediante una combinación de fuentes acuosas y dietéticas. En la actualidad no hay directrices derivadas empíricamente en lo que respecta a las concentraciones mínimas de yoduro. No obstante, la disponibilidad de yoduro puede afectar a la capacidad de respuesta del sistema tiroideo ante los agentes con actividad tiroidea, y se sabe que modula la actividad basal de la glándula tiroidea, aspecto que merece atención a la hora de interpretar los resultados histopatológicos de la glándula. Por lo tanto, deben registrarse las concentraciones medidas de yoduro acuoso en el agua del ensayo. Según los datos disponibles de los estudios de validación, se ha demostrado que el protocolo funciona bien cuando las concentraciones de yoduro ($I^-$) en el agua oscilan entre los 0,5 y los 10 µg/l. Idealmente, la concentración mínima de yoduro en el agua del ensayo debe ser de 0,5 µg/l. Si el agua del ensayo se ha reconstituido a partir de agua desionizada, debe añadirse yodo a una concentración mínima de 0,5 µg/l. En el informe debe figurar la eventual adición suplementaria al agua del ensayo de yodo u otras sales.

**Mantenimiento de los animales**

*Cría y cuidado de los adultos*

10. La cría y el cuidado de los adultos se llevan de acuerdo con las directrices normalizadas y se remite al lector a la guía estándar para llevar a cabo el ensayo de teratogenicidad con embriones de rana (FETAX) (6) para obtener información más detallada. Estas directrices normalizadas proporcionan un ejemplo de métodos adecuados para el cuidado y la cría, pero no se exige su cumplimiento estricto. Para inducir la cría, se inyecta gonadotrofina coriónica humana (hCG) a parejas (3-5) de hembras y machos adultos. A los especímenes de hembra y macho se les inyectan aproximadamente entre 800 y 1 000 UI y entre 600 y 800 UI, respectivamente, de hCG disuelta en una solución salina con una concentración entre el 0,6 y el 0,9 %. Las parejas de cría se mantienen en grandes recipientes, sin alteraciones y en condiciones estáticas con el objeto de fomentar el amplexo. El fondo de cada recipiente de cría debe tener un fondo falso de malla de acero inoxidable o plástico que permita que las masas de huevos caigan al fondo del recipiente. Normalmente, las ranas inyectadas a última hora de la tarde depositarán la mayor parte de sus huevos a media mañana del día siguiente. Cuando se haya liberado y fertilizado una cantidad suficiente de huevos, deben retirarse los adultos de los recipientes de cría.

*Cuidado y selección de las larvas*

11. Una vez que se hayan retirado los adultos de los recipientes de cría, se recogen los huevos y se evalúa su viabilidad mediante un subconjunto representativo de los embriones de todos los recipientes de cría. Deben conservarse los mejores desoves individuales (se recomiendan 2 o 3 para evaluar la calidad de los desoves) con arreglo a la viabilidad embrionaria y la presencia de un número adecuado (un mínimo de 1 500) de embriones. Todos los organismos utilizados en un estudio deben provenir de un solo desove (es decir, no deben mezclarse los desoves). Los embriones se trasladan a una bandeja o recipiente plano de gran tamaño y se retiran todos los huevos que claramente estén muertos o sean anómalos [véase la definición en (5)], con una pipeta o un cuentagotas. Los embriones sanos de cada uno

▼M6

de los tres desoves se transfieren a tres tanques de eclosión separados. Cuatro días después de colocarlos en los recipientes de incubación, se selecciona el mejor desove de acuerdo con su viabilidad y éxito de eclosión y las larvas se transfieren a un número adecuado de recipientes de cría a 22 ± 1 °C. Además, se transfieren algunas larvas más a recipientes extra para usarlas como sustitutas si se registran casos de mortalidad en los recipientes de cría durante la primera semana. Este procedimiento mantiene una densidad constante de organismos y, por ello, reduce la divergencia en el desarrollo dentro de la cohorte de un mismo desove. Todos los recipientes de cría deben limpiarse con ayuda de un sifón a diario. Como medida de precaución, se prefieren los guantes de vinilo o nitrilo a los guantes de látex. Cada día deben retirarse las larvas muertas y agregarse las larvas de sustitución para mantener la densidad de organismos durante la primera semana. La alimentación debe realizarse, como mínimo, dos veces al día.

12. Durante la fase previa a la exposición, los renacuajos se aclimatan a las condiciones de la fase de exposición en sí, incluido el tipo de alimento, la temperatura, el ciclo de luz y oscuridad y el medio de cultivo. Por lo tanto, se recomienda utilizar la misma agua de cultivo o dilución en la fase previa a la exposición y en la fase de exposición. Si se utiliza un sistema de cultivo estático para mantener los renacuajos durante la fase previa a la exposición, el medio de cultivo debe reemplazarse completamente al menos dos veces por semana. Debe evitarse el hacinamiento, provocado por grandes densidades de larvas, durante el periodo previo a la exposición, porque podría afectar de manera notable al desarrollo de los renacuajos durante la fase del ensayo posterior. Por lo tanto, la densidad de cría no debe superar aproximadamente los cuatro renacuajos por litro de medio de cultivo (sistema de exposición estática) o los 10 renacuajos por litro de medio de cultivo (por ejemplo, con un caudal de 50 ml/min en la fase previa a la exposición o en el sistema de cultivo). En estas condiciones, los renacuajos deberían desarrollarse de las fases 45/46 a la fase 51 en doce días. Deben inspeccionarse los renacuajos representativos de esta población cada día para comprobar su fase de desarrollo y, de esta manera, poder hacer una estimación del momento adecuado para iniciar la exposición. Debe tenerse cuidado de minimizar el estrés y los traumatismos para los renacuajos, especialmente durante la transferencia, la limpieza de los acuarios y la manipulación de las larvas. Deben evitarse las situaciones o actividades estresantes, tales como los ruidos fuertes o incesantes, los golpes en los acuarios, las vibraciones en los acuarios, un exceso de actividad en el laboratorio y los cambios rápidos en el entorno (disponibilidad de luz, temperatura, pH, OD, caudales de agua, etc.). Si los renacuajos no se desarrollan hasta la fase 51 en un plazo de 17 días a partir de su fertilización, esto se podría achacar a un exceso de estrés.

*Cultivo y alimentación de las larvas*

13. Los renacuajos se alimentan, por ejemplo con los alimentos comerciales para larvas utilizados en los estudios de validación (véase también el apéndice 1), durante todo el periodo previo a la exposición [tras la fase 45/46 Nieuwkoop y Faber (NF) (8)] y durante todo el periodo del ensayo de veintiún días, o con otra dieta que haya demostrado permitir la obtención de unos resultados equivalentes al Ensayo sobre metamorfosis de anfibios. El régimen de alimentación durante el periodo previo a la exposición debe ajustarse con cuidado para cubrir las necesidades de los renacuajos en desarrollo; es decir, deben suministrarse pequeñas porciones de alimento a los renacuajos recién salidos del huevo varias veces al día (como mínimo, dos veces). Debe evitarse un exceso de alimento para: *i)* mantener la calidad del agua, y *ii)* para evitar que los filtros de las branquias se atasquen con partículas de alimentos y residuos. En lo que respecta a los alimentos de los renacuajos utilizados en los estudios de validación, las raciones diarias de alimentos deben ir aumentando a medida que crecen los renacuajos, hasta llegar aproximadamente a 30 mg por animal y por día poco antes de iniciar el ensayo. En los estudios de validación se ha demostrado que este alimento comercial permite el crecimiento y desarrollo adecuados de los renacuajos de *X. laevis*, y que está formado por partículas

▼M6

finas que quedan suspendidas en la columna de agua durante un largo periodo de tiempo y pueden eliminarse con el flujo. Por lo tanto, la cantidad total diaria de alimento debe dividirse en porciones más pequeñas y suministrarse al menos dos veces al día. Este régimen de alimentación se resume en la tabla 1. Deben registrarse las tasas de alimentación. La alimentación se puede realizar en seco o prepararse una solución madre con agua de dilución. Cada dos días debe prepararse una nueva solución madre que, cuando no se utilice, debe conservarse a 4 °C.

*Tabla 1.*

**Régimen de alimentación con alimento comercial para renacuajos utilizado en los estudios de validación de los renacuajos de *X. laevis* durante la parte en vida del AMA en condiciones dinámicas**

| Día de estudio | Ración de alimento (mg de alimento por animal y día) |
|---|---|
| 0-4 | 30 |
| 5-7 | 40 |
| 8-10 | 50 |
| 11-14 | 70 |
| 15-21 | 80 |

**Química analítica**

14. Antes de llevar a cabo un estudio, debe evaluarse la estabilidad de la sustancia problema con la información existente sobre su solubilidad, degradabilidad y volatilidad. Deben recogerse muestras de las soluciones de ensayo de cada recipiente de réplica a cada concentración para realizar los análisis de química analítica al iniciar el ensayo (día 0) y durante el ensayo deben recogerse cuatro muestras como mínimo cada semana. Asimismo, se recomienda analizar cada concentración del ensayo durante la preparación del sistema, antes de iniciar el ensayo, para comprobar su comportamiento. Se recomienda también analizar las soluciones madre cuando se cambien, en particular si el volumen de la solución madre no proporciona unas cantidades de sustancia adecuadas para cubrir todos los periodos de muestreo habituales. En el caso de las sustancias que no puedan detectarse en algunas o en todas las concentraciones utilizadas en un ensayo, las soluciones madre deben medirse y los caudales del sistema deben medirse para poder calcular las concentraciones nominales.

**Suministro de la sustancia**

15. El método utilizado para introducir la sustancia problema en el sistema puede variar en función de sus propiedades fisicoquímicas. Las sustancias solubles en agua pueden disolverse en alícuotas de agua del ensayo a una concentración que permita su suministro a la concentración objetivo del ensayo en un sistema dinámico. Las sustancias líquidas a temperatura ambiente y escasamente solubles en agua pueden introducirse a través de métodos de saturación líquido:líquido. Las sustancias sólidas a temperatura ambiente y escasamente solubles en agua pueden introducirse mediante columnas de saturación de lana de vidrio (7). Se prefiere utilizar un sistema de ensayo sin portador; sin embargo, las distintas sustancias problema presentarán diversas propiedades fisicoquímicas que, probablemente, exigirán planteamientos distintos para la preparación del agua de exposición a la sustancia. Es preferible hacer todo lo posible por evitar el recurso a disolventes o portadores, por las razones siguientes: *i)* determinados disolventes pueden provocar toxicidad o respuestas endocrinas no deseadas o inesperadas; *ii)* las sustancias problema que se encuentran por encima de su

▼M6

solubilidad en el agua (algo que puede ocurrir con frecuencia cuando se usan disolventes) pueden provocar determinaciones incorrectas de las concentraciones eficaces; y *iii)* el uso de disolventes en ensayos a largo plazo puede provocar un nivel importante de «biopelículas» asociadas a la actividad microbiana. En el caso de las sustancias difíciles de utilizar en los ensayos, se puede utilizar un disolvente como último recurso; para determinar el mejor método debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas dificultosas (4). La selección del disolvente vendrá determinada por las propiedades químicas de la sustancia. Entre los disolventes que han demostrado su eficacia en los ensayos de toxicidad acuática se incluyen la acetona, el etanol, el metanol, la dimetilformamida y el trietilenglicol. En caso de que se utilice un disolvente portador, las concentraciones de disolvente deben ser inferiores a la concentración sin efecto observado (NOEC) de toxicidad crónica. El documento de orientación de la OCDE recomienda 100 µl/l como máximo; una reseña reciente recomienda que se utilicen concentraciones tan bajas como 20 µl/l de agua de dilución (12). Si se utilizan disolventes portadores, deben evaluarse controles de los disolventes correspondientes, además de los controles sin disolvente (agua limpia). Si no se puede administrar una sustancia a través del agua, debido bien a las características fisicoquímicas (baja solubilidad), bien a una disponibilidad limitada de la sustancia, se puede plantear su introducción a través de la dieta. Se han llevado a cabo trabajos preliminares sobre las exposiciones con la dieta; no obstante, esta vía de exposición no se utiliza habitualmente. El método seleccionado debe quedar documentado y verificarse analíticamente.

**Selección de las concentraciones de ensayo**

*Establecimiento de la concentración alta de ensayo*

16. A efectos de este ensayo, la concentración alta del ensayo debe corresponder al límite de solubilidad de la sustancia problema, la concentración máxima tolerada (MTC, de sus siglas en inglés) de las sustancias con toxicidad aguda o 100 mg/l, lo que sea más bajo.

17. La MTC se define como la concentración máxima de ensayo de la sustancia que da como resultado una mortalidad aguda inferior al 10 %. Con este planteamiento se asume que existen datos empíricos de mortalidad aguda a partir de los cuales se puede estimar la MTC. La estimación de la MTC puede ser inexacta y, por lo general, debe aplicarse el juicio de un profesional. Aunque el uso de modelos de regresión es tal vez el planteamiento más adecuado técnicamente para estimar la MTC, se puede derivar una aproximación útil de la MTC a partir de los datos existentes sobre toxicidad aguda, utilizando un tercio del valor de la $LC_{50}$ aguda. No obstante, es posible que no haya datos de toxicidad aguda de la especie del ensayo. Si no hay datos disponibles sobre toxicidad aguda específica de la especie, se puede realizar una prueba de $LC_{50}$ de 96 horas con renacuajos representativos (es decir, en la misma fase) de los que forman parte del AMA. Opcionalmente, si hubiera disponibles datos de otras especies acuáticas (por ejemplo, estudios de $LC_{50}$ con peces o con otras especies anfibias), podrá aplicarse el juicio profesional para realizar una estimación probable de la MTC recurriendo a una extrapolación entre especies.

18. Por otra parte, si la sustancia no presenta toxicidad aguda y es soluble por encima de los 100 mg/l, este nivel de 100 mg/l debe considerarse la concentración más alta del ensayo (HTC, de sus siglas en inglés), ya que esta concentración se considera típicamente como una concentración «prácticamente no tóxica».

▼M6

19. Aunque no es el procedimiento recomendado, se pueden utilizar métodos de renovación estática cuando los métodos dinámicos resulten inadecuados para alcanzar la MTC. Si se utilizan métodos de renovación estática, la estabilidad de la sustancia problema debe documentarse y permanecer dentro de los límites de los criterios de comportamiento. Se recomiendan periodos de renovación de veinticuatro horas. No son aceptables los periodos de renovación superiores a 72 horas. Asimismo, deben medirse parámetros de calidad del agua (por ejemplo, OD, temperatura, pH, etc.) al final de cada periodo de renovación, justo antes de la renovación.

*Intervalo de concentraciones de ensayo*

20. Hay un *mínimo* necesario de tres concentraciones de ensayo y un control de agua limpia (y, en caso necesario, un control del vehículo). El diferencial mínimo de concentración de ensayo entre la más alta y la más baja debe ser aproximadamente un orden de magnitud. El factor máximo de separación de dosis es 0,1 y el mínimo, 0,33.

PROCEDIMIENTO

**Inicio y realización del ensayo**

*Día 0*

21. La exposición debe comenzar cuando un número suficiente de renacuajos de la población previa a la exposición haya alcanzado la fase de desarrollo 51, con arreglo a Nieuwkoop y Faber (8), y cuya edad sea igual o inferior a 17 días a partir de la fertilización. Para la selección de los animales del ensayo, deben agruparse renacuajos sanos y de aspecto normal de la población, en un mismo recipiente que contenga un volumen adecuado de agua de dilución. Para determinar la fase de desarrollo, hay que retirar, uno a uno, los renacuajos del recipiente de agrupación, con una pequeña red o un filtro, y transferirlos a una cámara de medición transparente (por ejemplo, una placa de Petri de 100 mm) que contenga agua de dilución. Para determinar la fase, es preferible no utilizar anestesia, pero se pueden anestesiar los renacuajos individualmente con 100 mg/l de metanosulfonato de tricaína (por ejemplo, MS-222), tamponada adecuadamente con bicarbonato sódico (pH 7,0), antes de su manipulación. Si se utiliza, debe consultarse a laboratorios experimentados la metodología de uso apropiado de, por ejemplo, MS-222 como anestesia, que deberá incluirse en los resultados del ensayo. Los animales deben tratarse con cuidado durante este traslado para minimizar el estrés por manipulación y evitar lesiones.

22. La etapa de desarrollo de los animales se determina con un microscopio de disección binocular. Para reducir la variabilidad fundamental de la fase de desarrollo, es importante que se realice esta determinación de las fases con la máxima precisión posible. Según Nieuwkoop y Faber (8), el principal punto de referencia de desarrollo para seleccionar los organismos en la fase 51 es la morfología de las extremidades posteriores. Las características morfológicas de las extremidades posteriores deben analizarse con el microscopio. Aunque debe consultarse toda la guía de Nieuwkoop y Faber (8) para obtener información exhaustiva sobre la determinación de las fases de los renacuajos, estas se pueden determinar de manera fiable mediante puntos de referencia morfológicos prominentes. Puede utilizarse la tabla siguiente para simplificar y armonizar el proceso de determinación de las fases durante todo el estudio mediante la identificación de esos puntos de referencia morfológicos prominentes, correspondientes a distintas fases, partiendo de la base de que el desarrollo es normal.

▼M6

*Tabla 2.*

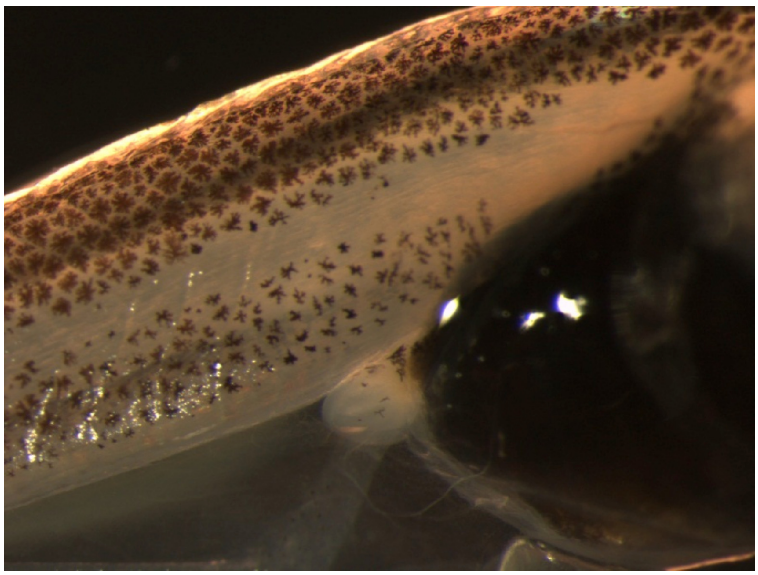
**Puntos de referencia morfológicos prominentes de fase de acuerdo con las pautas de Nieuwkoop y Faber.**

| Puntos de referencia morfológicos prominentes | Fase de desarrollo | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 |
| Extremidades posteriores | X | X | X | X | X | X | X | | | | | | | | | |
| Extremidades anteriores | | | | | | X | X | X | X | X | | | | | | |
| Estructura craneofacial | | | | | | | | | | X | X | X | X | | | |
| Morfología del nervio olfativo | | | | | | | | | | | X | X | X | | | |
| Longitud de la cola | | | | | | | | | | | | | X | X | X | X |

23. Para iniciar el ensayo, todos los renacuajos deben encontrarse en la fase 51. El punto de referencia morfológico de fase más prominente de esa fase es la morfología de las extremidades posteriores, que se muestra en la figura 1.

*Figura 1.*

**Morfología de las extremidades posteriores de un renacuajo de *X. laevis* en la fase 51.**



24. Además de la selección de la fase de desarrollo, se puede utilizar una selección opcional del tamaño de los animales del experimento. Para ello, debe medirse toda la longitud del cuerpo (y no la SVL) en el día 0 para obtener una submuestra de aproximadamente 20 renacuajos en la fase 51 NF. Tras calcular la longitud media de todo el cuerpo de este grupo de animales, pueden establecerse los límites mínimo y máximo de toda la longitud del cuerpo de los animales del experimento, dejando un intervalo del valor medio ± 3 mm (los valores medios de la longitud de todo el cuerpo se encuentran entre 24,0 y 28,1 mm para los renacuajos en la fase 51). Sin embargo, la determinación de las fases de desarrollo constituye el principal parámetro para establecer si los animales están listos para el ensayo. Los renacuajos que presenten malformaciones o lesiones visibles macroscópicamente deben excluirse del ensayo.

▼M6

25. Los renacuajos que reúnan los criterios de fase descritos anteriormente se mantendrán en un recipiente con agua de cultivo limpia hasta que finalice el proceso de determinación de fases. Una vez finalizada la determinación de fases, las larvas se distribuyen aleatoriamente en los recipientes de tratamiento de exposición hasta que cada recipiente contenga veinte larvas. A continuación, se inspecciona cada recipiente de tratamiento para determinar si hay animales de aspecto anómalo (por ejemplo, lesiones, comportamiento anómalo al nadar, etc.). Los renacuajos que presenten un aspecto manifiestamente poco saludable deben retirarse de los recipientes de tratamiento y sustituirse por larvas recién seleccionadas del recipiente de agrupación.

**Observaciones**

26. Para obtener más información sobre los procedimientos de finalización del ensayo y el procesamiento de los renacuajos, véase el documento de orientación de la OCDE sobre histología de la tiroides de los anfibios (9).

*Mediciones del día 7*

27. El día 7 se retirarán de cada recipiente de ensayo cinco renacuajos por réplica seleccionados aleatoriamente. El procedimiento aleatorio utilizado debe garantizar la misma probabilidad de selección a cada organismo del ensayo. Esto puede lograrse con cualquier método de aleatorización, pero se exige que cada renacuajo se recoja con la red. Los renacuajos no seleccionados se devuelven al recipiente de origen y los renacuajos seleccionados son sacrificados de manera compasiva en una concentración de 150 a 200 mg/l de, por ejemplo, MS-222, tamponada adecuadamente con bicarbonato sódico hasta alcanzar un valor de pH 7,0. Los renacuajos sacrificados se enjuagan con agua y se secan con material absorbente; a continuación se determina el peso corporal con precisión de un miligramo. Se determinan la distancia de las extremidades posteriores, la longitud entre el hocico y la abertura cloacal, y la fase de desarrollo (con un microscopio binocular de disección) de cada renacuajo.

*Mediciones del día 21 (fin del ensayo)*

28. Al finalizar el ensayo (día 21), los renacuajos restantes se retiran de los recipientes del ensayo y se sacrifican de manera compasiva en una concentración de 150 a 200 mg/l de, por ejemplo, MS-222, tamponada adecuadamente con bicarbonato sódico, como se ha indicado anteriormente. Los renacuajos se enjuagan con agua y se secan con material absorbente, y, a continuación, se determina el peso corporal con precisión de un miligramo. Se miden la fase de desarrollo, la SVL y la longitud de las extremidades posteriores de cada renacuajo.

29. Todas las larvas se colocan en fijador de Davidson durante un periodo de 48 a 72 horas, bien como muestras de cuerpo completo, bien como muestras de tejido recortado de la cabeza que contenga la mandíbula inferior para realizar evaluaciones histológicas. En lo que respecta a la histopatología, debe obtenerse una muestra total de cinco renacuajos de cada recipiente replicado. Como la altura de las células foliculares depende de la fase (10), el planteamiento de muestreo más apropiado para análisis histológicos consiste en utilizar individuos de la misma fase, siempre que sea posible. Para seleccionar individuos de la misma fase, se debe determinar la fase de todas las larvas antes de su selección y su procesamiento posterior para recopilar y conservar los datos. Esto es necesario porque la divergencia normal en el desarrollo redundará en unas distribuciones de fase diferenciadas en cada recipiente replicado.

30. Los animales seleccionados para el estudio histopatológico (n = 5 de cada réplica) deben coincidir con la fase mediana de los controles (réplicas agrupadas), siempre que sea posible. Si hay recipientes replicados con más de cinco larvas en la fase adecuada, se seleccionarán cinco larvas de forma aleatoria.

▼M6

31. Si hay recipientes replicados con menos de cinco larvas en la fase adecuada, se seleccionarán individuos de forma aleatoria que se encuentren en la fase de desarrollo inmediatamente anterior o posterior para obtener una muestra de tamaño total de cinco larvas por réplica. Preferiblemente, la decisión de recoger más larvas que se encuentren en la fase de desarrollo inmediatamente anterior o posterior debe tomarse con arreglo a una evaluación general de la distribución de fases en el control y los tratamientos con las sustancias. Es decir, si el tratamiento con la sustancia está asociado a un retraso en el desarrollo, debe realizarse entonces un muestreo adicional de larvas de la fase anterior. Por el contrario, si el tratamiento con la sustancia está asociado a una aceleración del desarrollo, debe realizarse entonces un muestreo adicional de larvas de la fase posterior.

32. En los casos de alteraciones graves del desarrollo de los renacuajos debido al tratamiento con la sustancia problema, es posible que no se produzca un solapamiento entre la distribución de las fases de los tratamientos con la sustancia y la fase de desarrollo mediana del control calculada. Solo en estos casos debe modificarse el proceso de selección utilizando una fase distinta a la fase mediana del control con el fin de lograr un muestreo de larvas de la misma fase para el estudio histopatológico de la tiroides. Por otra parte, si las fases no están determinadas (es decir, en caso de asincronía), deben seleccionarse aleatoriamente cinco renacuajos de cada réplica para llevar a cabo el análisis histológico. Deben indicarse los motivos que justifiquen el muestreo de cualquier larva que no se encuentre en una fase equivalente a la fase de desarrollo mediana del control.

**Determinación de parámetros biológicos**

33. Durante la fase de exposición de veintiún días, si bien se requiere la observación diaria de los animales del ensayo, en los días 7 y 21 del mismo se miden los parámetros principales. En la tabla 3 figura un resumen de los parámetros de medición y los puntos temporales de observación correspondientes. En los documentos de orientación de la OCDE (9) se proporciona información más detallada sobre los procedimientos técnicos para medir los parámetros principales y las evaluaciones histológicas.

*Tabla 3.*

**Puntos temporales de observación de los parámetros principales en el AMA.**

| Parámetros principales | Diariamente | Día 7 | Día 21 |
|---|---|---|---|
| — Mortalidad | • | | |
| — Fase de desarrollo | | • | • |
| — Longitud de las extremidades posteriores | | • | • |
| — Distancia entre el hocico y la abertura cloacal | | • | • |
| — Peso corporal húmedo | | • | • |
| — Histología de la glándula tiroidea | | | • |

▼M6

**Parámetros principales**

34. La fase de desarrollo, la longitud de las extremidades posteriores, la SVL y el peso húmedo constituyen los parámetros principales del AMA; más adelante se analizará brevemente cada uno de ellos. Se puede obtener más información técnica para recopilar estos datos en los documentos de orientación recogidos en la bibliografía, incluidos los procedimientos de análisis asistido por ordenador cuyo uso se recomienda.

*Fase de desarrollo*

35. La fase de desarrollo de los renacuajos de *X. laevis* se determina mediante los criterios de determinación de fases de Nieuwkoop y Faber (8). Los datos relativos a las fases de desarrollo se utilizan para determinar si el desarrollo se ha acelerado, es asíncrono, se ha retrasado o no se ha visto afectado. La aceleración o el retraso en el desarrollo se determinan estableciendo una comparación entre la fase mediana alcanzada por los grupos de control y por los grupos tratados. El desarrollo asíncrono se refleja cuando los tejidos examinados no presentan malformaciones ni anomalías, pero el tiempo relativo de la morfogénesis o del desarrollo de distintos tejidos se ve alterado en un mismo renacuajo.

*Longitud de las extremidades posteriores*

36. La diferenciación y el crecimiento de las extremidades posteriores se encuentran bajo el control de las hormonas tiroideas y constituyen puntos de referencia del desarrollo muy importantes, ya utilizados para determinar la fase de desarrollo. El desarrollo de las extremidades posteriores constituye un criterio cualitativo en la determinación de la fase de desarrollo, pero en este caso se considera un parámetro cuantitativo. Por lo tanto, la longitud de las extremidades posteriores se mide como parámetro para detectar el efecto sobre el eje tiroideo (figura 2). Por motivos de coherencia, la longitud de las extremidades posteriores se mide en la extremidad posterior izquierda. La longitud de las extremidades posteriores se evalúa tanto en el día 7 como en el día 21 del ensayo. El día 7, la medición de la longitud de las extremidades posteriores resulta sencilla, tal y como se ilustra en la figura 2. Sin embargo, la medición de la longitud de las extremidades posteriores el día 21 resulta más complicada debido a que las extremidades están dobladas. Por lo tanto, las mediciones de la longitud de las extremidades posteriores el día 21 deben comenzar en la pared corporal y seguir la línea media de la extremidad a través de cualquier desviación angular. Los cambios en la longitud de las extremidades posteriores el día 7, aunque no resulten evidentes el día 21, se siguen considerando significativos en relación con una posible actividad tiroidea. Las mediciones de longitud se obtienen a partir de fotografías digitales mediante un programa informático de análisis de imágenes, tal y como se describe en el documento de orientación de la OCDE sobre histología de la tiroides de los anfibios (9).

*Longitud del cuerpo y peso húmedo*

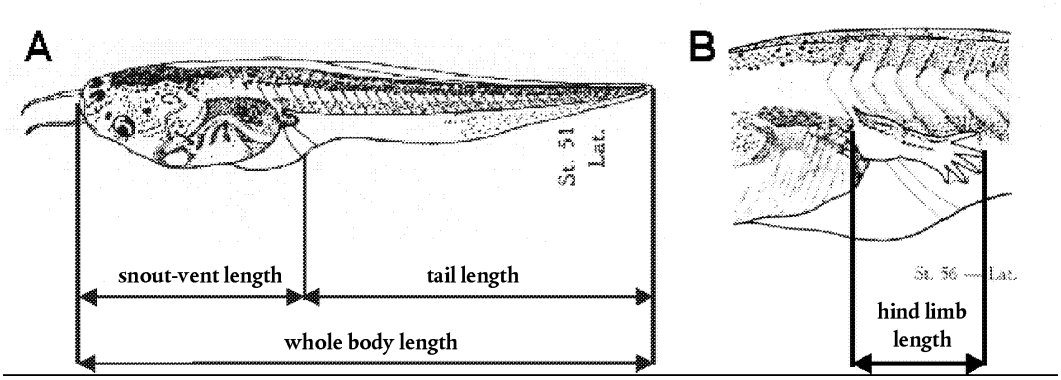
37. La determinación de la distancia entre el hocico y la abertura cloacal (SVL) (figura 2) y el peso húmedo se incluyen en el protocolo del ensayo para la evaluación de los posibles efectos de las sustancias problema en el ritmo de crecimiento de los renacuajos, en comparación con el grupo de control, además de resultar útiles para la detección de toxicidad general de la sustancia problema. Como la eliminación del agua adherida para determinar el peso puede dar lugar a situaciones de estrés para los renacuajos y puede provocar daños en la piel, estas mediciones se realizan en los renacuajos de la submuestra del día 7 y en todos los renacuajos restantes el día que finaliza el ensayo (día 21). Por motivos de coherencia, se debe utilizar la parte anterior de la abertura cloacal como límite posterior de la medición.

38. La distancia entre el hocico y la abertura cloacal (SVL) se utiliza para evaluar el crecimiento de los renacuajos, tal y como se ilustra en la figura 2.

▼M6

*Figura 2.*

**(A) Tipos de medición de longitud del cuerpo y (B) mediciones de las extremidades posteriores de renacuajos de *X. laevis* (1).**




**Histología de la glándula tiroidea**

39. Si bien la fase de desarrollo y la longitud de las extremidades posteriores constituyen parámetros importantes para evaluar los cambios relacionados con la exposición en el desarrollo metamórfico, el retraso en el desarrollo no se puede considerar, por sí solo, un indicador de diagnóstico de actividad antitiroidea. Es posible que algunos de los cambios solo se puedan observar mediante un análisis histopatológico ordinario. Entre los criterios de diagnóstico se incluyen la hipertrofia/atrofia de la glándula tiroidea, la hipertrofia de células foliculares y la hiperplasia de células foliculares; y, como criterios cualitativos adicionales: el área de la luz folicular, la calidad de los coloides y la altura o forma de las células foliculares. Debe indicarse la clasificación de gravedad (4 grados). Se puede obtener información sobre la obtención y el procesamiento de muestras para el análisis histológico y sobre la realización de estos análisis con muestras de tejido en «Amphibian Metamorphosis Assay: Part 1 — Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation» («Ensayo sobre metamorfosis de anfibios: Parte 1 — Orientación técnica para el muestreo morfológico y la preparación histológica»); y en «Amphibian Metamorphosis Assay: Part 2 — Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading and atlas» («Ensayo sobre metamorfosis de anfibios: Parte 2 — Planteamiento de la lectura de estudios, criterios de diagnóstico, clasificación de la gravedad y atlas») (9). Los laboratorios que realicen el ensayo por primera vez deben consultar a anatomopatólogos con experiencia para recibir formación antes de llevar a cabo el análisis histológico y la evaluación de la glándula tiroides. Los cambios evidentes y significativos de los parámetros principales que indiquen una aceleración o una asincronía del desarrollo pueden excluir la necesidad de realizar dicho análisis con la glándula tiroidea. Sin embargo, la ausencia de cambios morfológicos evidentes o de pruebas de retraso en el desarrollo impone la realización de análisis histopatológicos.

**Mortalidad**

40. Cada día hay que comprobar si hay renacuajos muertos en todos los recipientes del ensayo; las cifras de cada recipiente deben quedar registradas. Debe registrarse la fecha, la concentración y el número de recipiente de toda mortalidad observada. Los animales muertos deben extraerse del recipiente del ensayo en cuanto se observen. Las tasas de mortalidad que superen el 10 % podrían indicar unas condiciones incorrectas del ensayo o efectos tóxicos de la sustancia problema.

**Observaciones complementarias**

41. Deben registrarse los casos de comportamiento anómalo y las malformaciones y lesiones visibles macroscópicamente. Debe registrarse la fecha, la concentración y el número de recipiente de toda observación de comportamiento anómalo y de malformaciones o lesiones macroscópicas. El comportamiento normal se caracteriza por la suspensión de los renacuajos en la columna de agua con la cola elevada por encima de la cabeza, el movimiento regular y rítmico de la aleta de la cola, la subida periódica a la superficie, la formación del opérculo y la respuesta ante estímulos. El comportamiento anómalo incluiría, por ejemplo, flotar en la superficie, quedarse en el fondo

▼M6

del recipiente, nadar de forma inversa o irregular, ausencia de actividad en la superficie y de respuesta ante estímulos. Deben registrarse asimismo las eventuales grandes diferencias en el consumo de alimentos entre tratamientos. Las malformaciones y lesiones macroscópicas podrían incluir anomalías morfológicas (por ejemplo, deformidades de las extremidades), lesiones hemorrágicas, infecciones bacterianas o fúngicas, entre otras. Estas determinaciones son cualitativas y deben considerarse similares a los indicios clínicos de enfermedad o estrés, además de establecerse comparándolas con los animales de control. Si la incidencia o la tasa de incidencia son superiores en los recipientes expuestos que en los de control, se deben considerar como prueba de toxicidad clara.

DATOS E INFORME

**Recopilación de datos**

42. Todos los datos deben recopilarse mediante sistemas electrónicos o manuales conformes a las buenas prácticas de laboratorio (BPL). Los datos del estudio deben incluir:

*Sustancia problema:*

— Caracterización de la sustancia problema: propiedades físicas y químicas, información sobre estabilidad y biodegradabilidad.

— Información y datos sobre la sustancia: método y frecuencia de preparación de las diluciones. La información sobre la sustancia problema incluye las concentraciones reales y nominales de la sustancia problema y, en algunos casos, de la sustancia no original, según corresponda. Es posible que se requieran mediciones de la sustancia problema tanto en las soluciones madre como en las soluciones del ensayo.

— Disolvente (si fuera distinto al agua): justificación del disolvente seleccionado y caracterización del disolvente (tipo, concentración utilizada).

*Condiciones de ensayo:*

— Registros operativos: consisten en observaciones correspondientes al funcionamiento del sistema del ensayo y del entorno y la infraestructura de apoyo. Los registros típicos incluyen los siguientes elementos: temperatura ambiente, temperatura del ensayo, fotoperiodo, estado de los componentes esenciales del sistema de exposición (por ejemplo, bombas, contadores de ciclos, presiones), caudales, niveles de agua, cambios de botella de solución y registros de alimentación. En los parámetros generales de calidad del agua se incluyen los elementos siguientes: pH, OD, conductividad, yodo total, alcalinidad y dureza.

— Desviaciones del método de ensayo: esta información debe incluir cualquier información o descripción explicativa de las desviaciones del método de ensayo.

*Resultados:*

— Observaciones y datos biológicos: incluyen las observaciones diarias de mortalidad, el consumo de alimentos, el comportamiento anómalo al nadar, el letargo, la pérdida de equilibrio, las malformaciones y las lesiones, entre otras. Las observaciones y los datos recopilados a intervalos predeterminados incluyen los siguientes elementos: fase de desarrollo, longitud de las extremidades posteriores, distancia entre el hocico y la abertura cloacal, y peso húmedo.

▼M6

— Técnicas analíticas estadísticas y justificación de las técnicas utilizadas; resultados de los análisis estadísticos, preferiblemente en formato de tabla.

— Datos histológicos: incluyen descripciones explicativas, así como la clasificación de la gravedad y las puntuaciones de incidencia de observaciones específicas, tal y como se detallan en el documento de orientación de histopatología.

— Observaciones concretas: estas observaciones deben incluir descripciones explicativas del estudio que no se ajusten a las categorías descritas anteriormente.

**Presentación de datos**

43. El apéndice 2 contiene hojas de cálculo para la recopilación de datos diarios que se pueden utilizar como orientación para introducir datos brutos y para calcular estadísticas de resumen. Asimismo, se proporcionan tablas informativas que resultan cómodas para comunicar los resúmenes de datos sobre parámetros. En el apéndice 2 se pueden consultar tablas informativas para evaluaciones histológicas.

**Criterios de comportamiento y aceptabilidad y validez del ensayo**

44. En general, las grandes desviaciones del método de ensayo generarán datos no aceptables para su interpretación o comunicación. Por lo tanto, los siguientes criterios que figuran en la tabla 4 se han concebido como orientación a la hora de determinar la calidad del ensayo realizado y el comportamiento general de los organismos de control.

*Tabla 4.*

**Criterios de comportamiento del AMA.**

| Criterio | Límites aceptables |
|---|---|
| Concentraciones de ensayo | Se mantienen con un CV ≤ 20 % (variabilidad de la concentración medida del ensayo; de sus siglas en inglés) durante el ensayo de veintiún días. |
| Mortalidad en los controles | ≤ 10 %: la mortalidad en cualquiera de las réplicas de los controles no debe ser superior a dos renacuajos. |
| Fase de desarrollo mediana mínima de los controles al final del ensayo | 57 |
| Extensión de la fase de desarrollo en el grupo de control | Los percentiles 10 y 90 de la distribución de las fases de desarrollo no deben variar en más de cuatro fases. |
| Oxígeno disuelto | ≥ 40 % de saturación de aire (*) |
| pH | El pH debe mantenerse entre 6,5 y 8,5. Los diferenciales entre réplicas o entre tratamientos no deben ser superiores a 0,5. |
| Temperatura del agua | 22° ± 1 °C: los diferenciales entre réplicas o entre tratamientos no deben ser superiores a 0,5 °C. |
| Concentraciones del ensayo sin toxicidad manifiesta | ≥ 2 |
| Comportamiento de las réplicas | Se pueden ver comprometidas dos réplicas como máximo en todo el ensayo. |

▼M6

| Criterio | Límites aceptables |
|---|---|
| Condiciones especiales relativas al uso de un disolvente | Si se utiliza un disolvente portador, deben utilizarse tanto un control de disolvente como un control de agua limpia, y los resultados deben registrarse. |
| | Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de control de disolvente y de control de agua se tratan de forma especial. Encontrará más información más adelante. |
| Condiciones especiales del sistema de renovación estática | Deben comunicarse los análisis de sustancias representativas antes y después de la renovación. |
| | Los niveles de amoníaco se deben medir justo antes de la renovación. |
| | Todos los parámetros de calidad del agua enumerados en la tabla 1 del apéndice 1 deben medirse justo antes de la renovación. |
| | El periodo de renovación no debe superar las 72 horas. |
| | Horario de alimentación adecuado (el 50 % de la ración diaria de alimento comercial para renacuajos) |

(*) La aireación del agua puede mantenerse mediante borboteadores. Se recomienda instalar borboteadores a niveles que no causen un estrés indebido a los renacuajos.

**Validez del ensayo**

45. Se deben cumplir los siguientes requisitos para considerar aceptable o válido un ensayo:

Experimento válido en un ensayo determinado como negativo en relación con la actividad tiroidea:

1) En cualquier tratamiento (incluidos los controles), la mortalidad no puede superar el 10 %. En cualquier réplica, la mortalidad no puede superar los tres renacuajos; de lo contrario, se considera que la réplica se ha comprometido.

2) Para llevar a cabo el análisis, debe haber al menos dos niveles de tratamiento con las cuatro réplicas sin comprometer.

3) Para llevar a cabo el análisis, debe haber al menos dos niveles de tratamiento sin toxicidad manifiesta.

Experimento válido en un ensayo determinado como positivo en relación con la actividad tiroidea:

1) La mortalidad en el grupo de control no puede afectar a más de dos renacuajos por réplica.

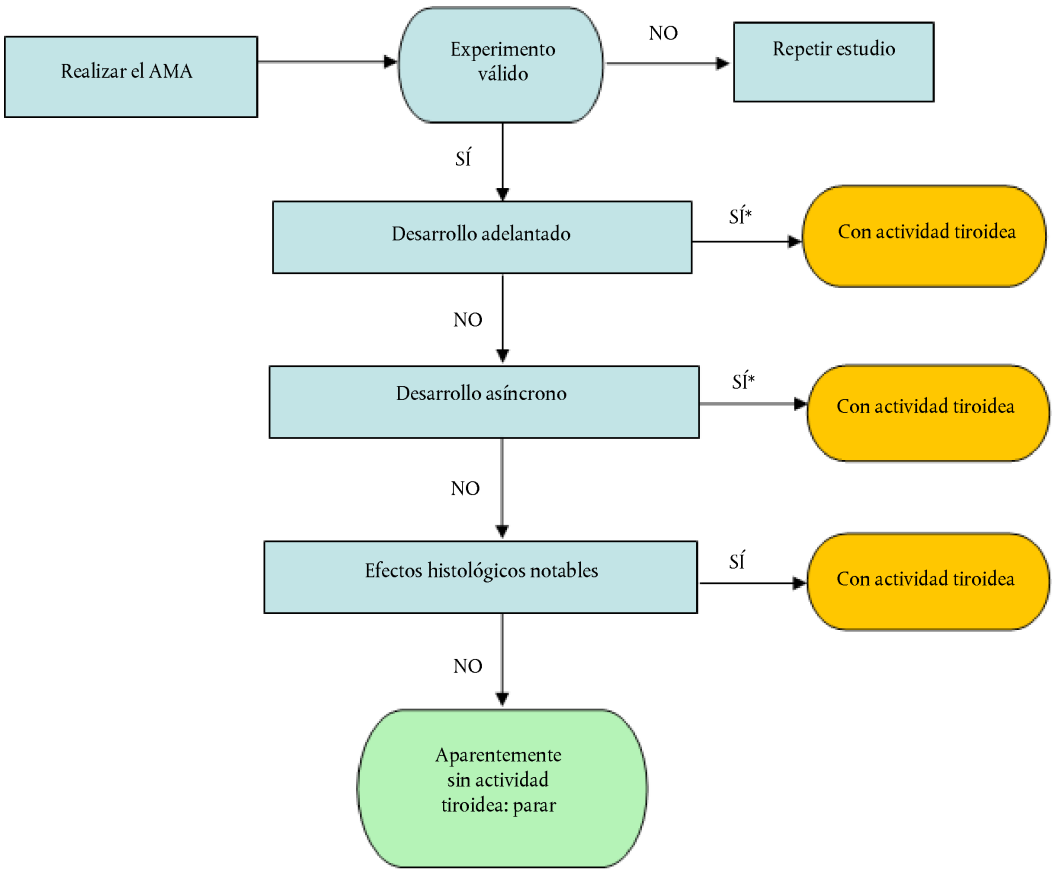
**Pauta de decisión para llevar a cabo el AMA**

46. Se desarrolló una pauta de decisión para el AMA con el fin de proporcionar ayuda lógica en la realización e interpretación de los resultados del bioensayo (véase el diagrama de flujo de la figura 3). Básicamente, la pauta de decisión pondera los parámetros de forma que el desarrollo adelantado, el desarrollo asíncrono y la histopatología tiroidea tienen un mayor peso, mientras que el desarrollo retrasado, la distancia entre el hocico y la abertura cloacal y el peso húmedo, que son parámetros que pueden verse afectados por la toxicidad general, se consideran de menor peso.

▼M6

*Figura 3.*

**Pauta de decisión para llevar a cabo el AMA.**




* Algunas autoridades reguladoras pueden exigir el estudio histológico a pesar de que haya diferencias significativas en el desarrollo avanzado y el desarrollo asíncrono. Se insta a la entidad que lleve a cabo este ensayo a consultar a las autoridades pertinentes antes de realizar el ensayo a fin de determinar cuáles son los parámetros necesarios.

*Desarrollo adelantado (determinado mediante la fase de desarrollo, la SVL y la HLL)*

47. Se sabe que el adelanto del desarrollo solo se produce mediante efectos relacionados con las hormonas tiroideas. Estos pueden ser efectos en el tejido periférico, como una interacción directa con el receptor de la hormona tiroidea (como con la T4) o efectos que alteran los niveles circulantes de las hormonas tiroideas. En cualquier caso, se considera prueba suficiente para indicar que la sustancia tiene actividad tiroidea. Hay dos formas de evaluar el adelanto del desarrollo. En primer lugar, la fase de desarrollo general se puede evaluar mediante el método armonizado detallado en Nieuwkoop y Faber (8). En segundo lugar, se pueden cuantificar características morfológicas específicas, como la longitud de las extremidades posteriores, tanto en el día 7 como en el 21, que se relacionan positivamente con los efectos agonistas sobre el receptor de la hormona tiroidea. Si se produce un adelanto estadísticamente significativo en el desarrollo o en la longitud de las extremidades posteriores, el ensayo indicará que la sustancia tiene actividad tiroidea.

▼**M6**

48. La evaluación de los animales del ensayo para comprobar la presencia de un desarrollo acelerado con respecto a la población de control se basará en los resultados de los análisis estadísticos realizados con respecto a los cuatro parámetros siguientes:

— longitud de las extremidades posteriores (normalizada por la SVL) el día 7 del ensayo;

— longitud de las extremidades posteriores (normalizada por la SVL) el día 21 del ensayo;

— etapa de desarrollo en el día 7 del ensayo; y

— etapa de desarrollo en el día 21 del ensayo.

49. Deben llevarse a cabo análisis estadísticos de la longitud de las extremidades posteriores basándose en las mediciones de la longitud de la extremidad posterior izquierda. La longitud de las extremidades posteriores se normaliza utilizando la relación de la longitud de las extremidades posteriores con la distancia entre el hocico y la abertura cloacal de un individuo. Después se compara la media de los valores normalizados de cada nivel de tratamiento. En este sentido, la aceleración del desarrollo se establece por un aumento importante de la longitud (normalizada) media de las extremidades posteriores de un grupo de tratamiento con la sustancia en comparación con el grupo de control los días 7 o 21 del ensayo (véase el apéndice 3).

50. Deben realizarse análisis estadísticos de la fase de desarrollo basándose en la determinación de las fases de desarrollo de acuerdo con los criterios morfológicos descritos por Nieuwkoop y Faber (8). La aceleración del desarrollo se determina cuando el análisis multicuántico detecta un aumento importante de los valores de la fase de desarrollo en un grupo de tratamiento con la sustancia en comparación con el grupo de control los días 7 o 21 del ensayo.

51. En el método de ensayo AMA, un efecto significativo en cualquiera de los cuatro parámetros mencionados anteriormente se considera suficiente para una detección positiva de un desarrollo acelerado. Es decir, unos efectos significativos en la longitud de las extremidades posteriores en un momento determinado no exigen la corroboración mediante efectos significativos en la longitud de las extremidades posteriores en el otro momento alternativo ni mediante efectos significativos en la fase de desarrollo en ese momento en cuestión. A su vez, unos efectos significativos en la fase de desarrollo en un momento determinado no exigen la corroboración mediante efectos significativos en la fase de desarrollo en el otro momento alternativo ni mediante efectos significativos en la longitud de las extremidades posteriores en ese momento en cuestión. No obstante, el peso de la prueba del adelanto del desarrollo aumentará si se detectan efectos significativos en más de un parámetro.

*Desarrollo asíncrono (determinado mediante criterios de la fase de desarrollo)*

52. El desarrollo asíncrono se caracteriza por la perturbación del ritmo relativo de la morfogénesis o del desarrollo de distintos tejidos en un mismo renacuajo. La incapacidad para establecer claramente la fase de desarrollo de un organismo mediante el conjunto de parámetros morfológicos que se considera típico en cualquier fase específica sugiere que los tejidos se están desarrollando de forma asíncrona a través de la metamorfosis. El desarrollo asíncrono es un indicador de actividad tiroidea. Los únicos mecanismos de acción conocidos que causan desarrollo asíncrono tienen lugar debido a los efectos de sustancias en la acción periférica de la hormona tiroidea o en el metabolismo de la hormona tiroidea en los tejidos en desarrollo, como se observa con los inhibidores de las desyodasas.

▼**M6**

53. La evaluación de los animales de ensayo para comprobar la presencia de desarrollo asíncrono en relación con la población de control se basará en el examen morfológico macroscópico de los animales de ensayo los días 7 y 21 del mismo.

54. La descripción del desarrollo normal del *Xenopus laevis* por Nieuwkoop y Faber (8) proporciona el marco para identificar un orden secuencial en la remodelación del tejido normal. El término «desarrollo asíncrono» hace referencia específicamente a las desviaciones en el desarrollo morfológico macroscópico de los renacuajos que impiden la determinación definitiva de una fase de desarrollo de conformidad con los criterios de Nieuwkoop y Faber (8) porque los puntos de referencia morfológicos clave reflejan características de fases distintas.

55. Tal y como implica el término «desarrollo asíncrono», solo deben considerarse los casos que reflejen desviaciones en la progresión de la remodelación de ciertos tejidos con respecto a la progresión de la remodelación de otros tejidos. Algunos fenotipos clásicos incluyen el retraso o la ausencia de la aparición de las extremidades anteriores, a pesar de un desarrollo normal o adelantado de los tejidos de las extremidades posteriores y de la cola, o la reabsorción precoz de las branquias en relación con la fase de morfogénesis de las extremidades posteriores y de reabsorción de la cola. Se registrará que un animal presenta desarrollo asíncrono si no puede asignarse a una fase porque no cumple la mayoría de los criterios de desarrollo de los puntos de referencia correspondiente a una fase concreta de Nieuwkoop y Faber (8), o si se produce un retraso o una aceleración extremos de una o varias características principales (por ejemplo, reabsorción completa de la cola, pero sin emergencia de las extremidades anteriores). Esta evaluación se realiza cualitativamente y debe examinar todo el conjunto de características de referencia enumeradas por Nieuwkoop y Faber (8). Sin embargo, no es necesario registrar la fase de desarrollo de las diversas características de referencia de los animales observados. A los animales registrados con desarrollo asíncrono no se les asigna una fase de desarrollo de Nieuwkoop y Faber (8).

56. Por lo tanto, un criterio principal para designar casos de desarrollo morfológico anómalo como casos de «desarrollo asíncrono» es que se vea alterado el ritmo relativo de la remodelación de tejidos y de la morfogénesis de tejidos, sin que sea manifiestamente anómala la morfología de los tejidos afectados. Un ejemplo que ilustra esta interpretación de anomalías morfológicas macroscópicas es que el retraso en la morfogénesis de las extremidades posteriores en relación con el desarrollo de otros tejidos cumplirá el criterio de «desarrollo asíncrono», mientras que los casos con ausencia de extremidades posteriores, presencia de dedos anómalos (por ejemplo, ectrodactilia o polidactilia), u otras malformaciones manifiestas en las extremidades, no deben considerarse «desarrollo asíncrono».

57. En este contexto, los principales puntos de referencia morfológicos cuya progresión metamórfica coordinada ha de evaluarse deben incluir la morfogénesis de las extremidades posteriores, la morfogénesis de las extremidades anteriores, la aparición de las extremidades anteriores, la fase de reabsorción de la cola (en particular, la reabsorción de la aleta de la cola) y la morfología de la cabeza (por ejemplo, tamaño de las branquias y fase de reabsorción de las branquias, morfología de la mandíbula inferior, protrusión del cartílago de Meckel).

58. En función del mecanismo de acción de la sustancia, se pueden producir diferentes fenotipos morfológicos macroscópicos. Algunos fenotipos clásicos incluyen el retraso o la ausencia de la aparición de las extremidades anteriores, a pesar de un desarrollo normal o adelantado de los tejidos de las extremidades posteriores y de la cola, así como la reabsorción precoz de las branquias en relación con las extremidades posteriores y la remodelación de la cola.

▼**M6**

*Histopatología*

59. Si la sustancia no provoca una toxicidad manifiesta y no acelera el desarrollo ni causa un desarrollo asíncrono, se realiza una evaluación histopatológica de la glándula tiroidea con ayuda del documento de orientación correspondiente (9). El retraso del desarrollo, en ausencia de toxicidad, constituye un indicador importante de actividad antitiroidea, pero el análisis de la fase de desarrollo es menos sensible y tiene menos valor diagnóstico que el análisis histopatológico de la glándula tiroidea. Por lo tanto, en este caso es necesario llevar a cabo el análisis histopatológico de la glándula tiroidea. Se han demostrado efectos en la histología de la glándula tiroidea en ausencia de efectos en el desarrollo. Si se producen cambios en la histopatología de la tiroides, se considerará que la sustancia tiene actividad tiroidea. Si no se producen retrasos en el desarrollo ni se observan lesiones histológicas en la glándula tiroidea, se considerará que la sustancia no tiene actividad tiroidea. Esta decisión se fundamenta en que la glándula tiroidea se encuentra bajo la influencia de la TSH y cualquier sustancia que altere la hormona tiroidea circulante de forma suficiente como para alterar la secreción de TSH dará como resultado cambios histopatológicos en la glándula tiroidea. Son varios los modos y mecanismos de acción que pueden alterar la hormona tiroidea circulante. Por lo tanto, aunque el nivel de la hormona tiroidea indica un efecto relacionado con la tiroides, resulta insuficiente para determinar cuál es el modo o el mecanismo de acción relacionado con la respuesta.

60. Como este parámetro no se presta al uso de los métodos estadísticos básicos, la determinación de un efecto relacionado con la exposición a una sustancia se establecerá según la opinión experta de un histopatólogo.

*Retraso en el desarrollo (determinado según la fase de desarrollo, HLL, BW y SVL)*

61. Se puede producir un retraso en el desarrollo mediante mecanismos antitiroideos y mediante toxicidad indirecta. Los retrasos leves en el desarrollo con signos evidentes de toxicidad indican probablemente un efecto tóxico inespecífico. La evaluación de la toxicidad no tiroidea constituye un elemento esencial del ensayo para reducir la probabilidad de resultados positivos falsos. Una mortalidad excesiva refleja claramente que se están produciendo otros mecanismos tóxicos. De forma similar, las reducciones leves en el crecimiento, determinadas mediante el peso húmedo o la SVL, también sugieren toxicidad no tiroidea. Con las sustancias que afectan negativamente al desarrollo normal se observan con frecuencia aumentos aparentes en el crecimiento. Por consiguiente, la presencia de animales de mayor tamaño no indica necesariamente que haya toxicidad no tiroidea. Sin embargo, nunca hay que basarse exclusivamente en el crecimiento para determinar la toxicidad tiroidea. Más bien, debe utilizarse el crecimiento junto con la fase de desarrollo y la histopatología de la tiroides para determinar si hay actividad tiroidea. Hay otros parámetros que también deberían tenerse en cuenta para determinar una toxicidad manifiesta, incluyendo edemas, lesiones hemorrágicas, letargo, reducción del consumo de alimentos, comportamiento errático o alterado al nadar, etc. Si todas las concentraciones del ensayo reflejan indicios de toxicidad manifiesta, debe volver a evaluarse la sustancia problema a concentraciones más bajas antes de determinar si la sustancia presenta una posible actividad o inactividad tiroidea.

62. Los retrasos en el desarrollo estadísticamente significativos, a falta de otros indicios de toxicidad manifiesta, indican que la sustancia tiene actividad tiroidea (antagonista). A falta de respuestas estadísticas sólidas, este resultado puede reforzarse con los resultados del estudio histopatológico de la tiroides.

▼M6

**Análisis estadísticos**

63. Los análisis estadísticos de los datos deben seguir, preferiblemente, los procedimientos descritos en el documento «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application» (11). En lo que respecta a todos los parámetros cuantitativos continuos (HLL, SVL, peso húmedo) coherentes con una relación dosis-respuesta monótona, debe aplicarse la prueba de Jonckheere-Terpstra de ajuste secuencial para establecer un efecto significativo del tratamiento.

64. En lo que respecta a los parámetros continuos no coherentes con una relación dosis-respuesta monótona, los datos deben evaluarse para determinar su normalidad (preferiblemente con la prueba de Shapiro-Wilk o la de Anderson-Darling) y la homogeneidad de la varianza (preferiblemente con la prueba de Levene). Ambas pruebas se realizan con los valores residuales de un análisis de varianza (ANOVA). Se pueden utilizar juicios de expertos en lugar de estas pruebas formales para determinar la normalidad y la homogeneidad de la varianza, aunque se prefieren las pruebas formales. En caso de anormalidad o de heterogeneidad en la varianza, se debe buscar una transformación para estabilizar la varianza. Si los datos (quizás después de una transformación) se distribuyen normalmente con una varianza homogénea, se determinará un efecto significativo del tratamiento a partir de una prueba de Dunnett. Si los datos (quizás después de una transformación) se distribuyen normalmente con una varianza heterogénea, se determinará un efecto significativo del tratamiento a partir de una prueba de Tamhane-Dunnett o T3, o a partir de la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon. Cuando no se pueda encontrar ninguna transformación normalizadora, se determinará un efecto significativo del tratamiento a partir de la prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon, utilizando un ajuste de Bonferroni-Holm a los valores p. La prueba de Dunnett se aplica independientemente de cualquier prueba F del ANOVA y la prueba de Mann-Whitney se aplica independientemente de cualquier prueba general de Kruskal-Wallis.

65. No se espera una mortalidad significativa, pero este factor debe evaluarse con el procedimiento de ajuste secuencial de la prueba de Cochran-Armitage cuando los datos sean coherentes con la monotonicidad de la relación dosis-respuesta y, en caso contrario, con una prueba exacta de Fisher con corrección de Bonferroni-Holm.

66. Un efecto significativo del tratamiento en cuanto a la fase de desarrollo se determina a partir de la aplicación secuencial de la prueba de Jonckheere-Terpstra aplicada a las medianas de las réplicas. Por otra parte, y de forma preferible, se debe usar la prueba multicuántica de Jonckheere entre los percentiles 20 y 80 para determinar los efectos, ya que tiene en cuenta los cambios en el perfil de distribución.

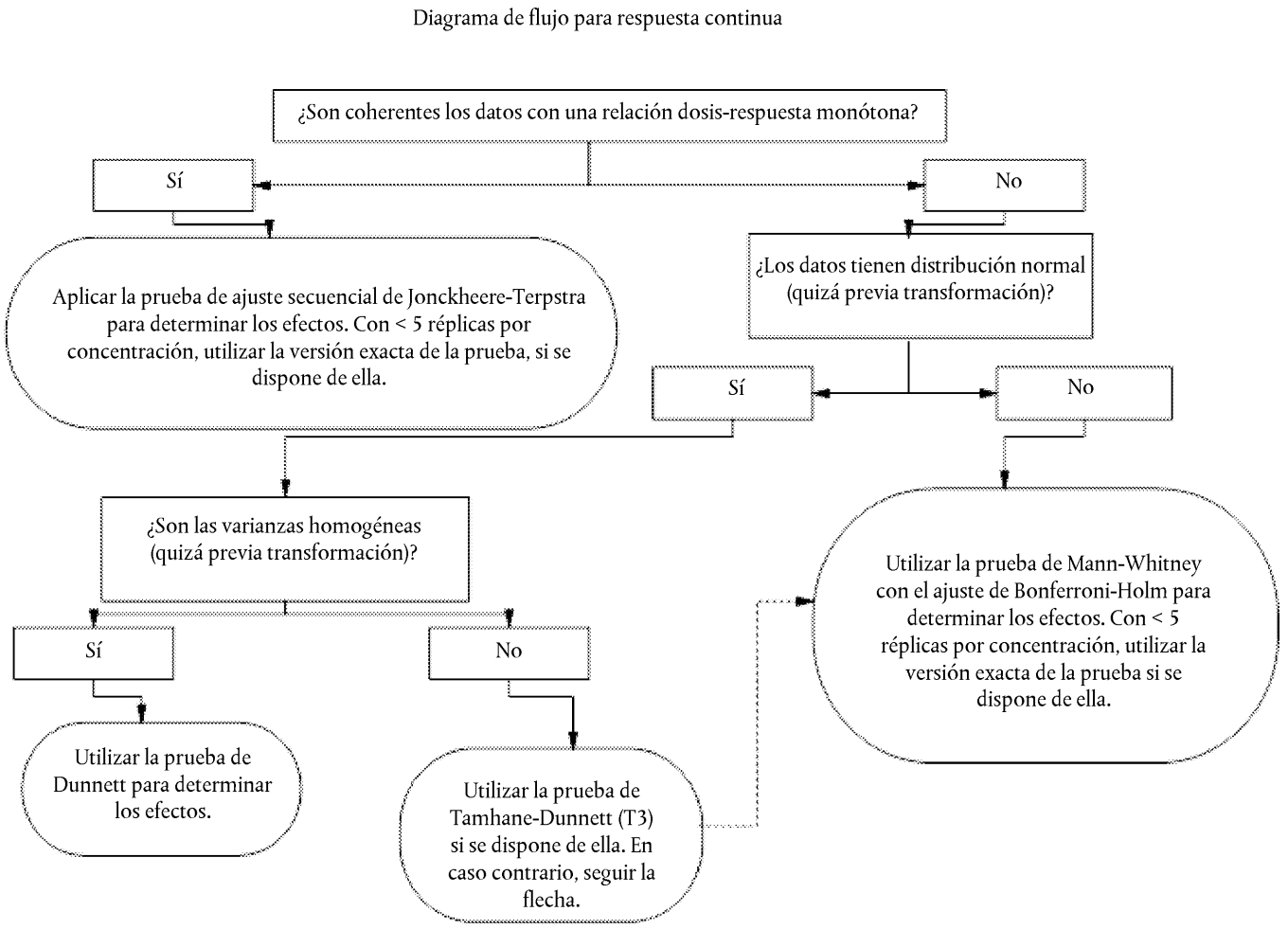
67. La unidad adecuada de análisis es la réplica, de forma que los datos se componen de las medianas de las réplicas si se utiliza la prueba de Jonckheere-Terpstra o la prueba U de Mann-Whitney, o bien de las medias de las réplicas si se utiliza la prueba de Dunnett. La monotonicidad de la relación dosis-respuesta puede evaluarse visualmente a partir de las medias o medianas de las réplicas y de los tratamientos, o a partir de pruebas formales, como las descritas anteriormente (11). Con menos de cinco réplicas por tratamiento o control, deben utilizarse las versiones exactas de permutación de las pruebas de Jonckheere-Terpstra y Mann-Whitney, si están disponibles. La significación estadística de todas las pruebas indicadas se establece en el nivel de significación 0,05.

68. La figura 4 presenta un diagrama de flujo para realizar pruebas estadísticas con los datos continuos.

▼M6

*Figura 4.*

**Diagrama de flujo para métodos estadísticos con datos continuos de respuesta.**




02008R0440 — ES — 16.10.2019 — 008.001 — 2222

▼M6

**Consideraciones especiales sobre el análisis de datos**

*Uso de los niveles de tratamiento comprometidos*

69. Hay varios factores que se tienen en cuenta a la hora de determinar si una réplica o un tratamiento entero demuestran toxicidad manifiesta y deben eliminarse del análisis. La toxicidad manifiesta se define como más de dos mortalidades en cualquier réplica que únicamente puedan explicarse por toxicidad en lugar de por un error técnico. Entre otros signos de toxicidad manifiesta se incluyen hemorragia, comportamientos anómalos, forma anómala de nadar, anorexia y cualquier otro signo clínico de enfermedad. En lo que respecta a los signos de toxicidad subletales, es posible que sea necesario realizar evaluaciones cualitativas, que siempre deben hacerse en relación con el grupo de control de agua limpia.

*Controles de disolvente*

70. El uso de un disolvente solo debe plantearse como último recurso una vez considerado el resto de opciones de introducción de la sustancia. Si se utiliza un disolvente, debe llevarse a cabo conjuntamente con un control de agua limpia. Al finalizar el ensayo, debe efectuarse una evaluación de los efectos potenciales del disolvente. Esto se realiza mediante una comparación estadística del grupo de control de disolvente y el grupo de control de agua limpia. Los parámetros más relevantes que se deben tener en cuenta en este análisis son la fase de desarrollo, la SVL y el peso húmedo, ya que pueden verse afectados por toxicidades no tiroideas. Si se detectan diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros entre el grupo de control de agua limpia y el grupo de control de disolvente, se deben determinar los parámetros del ensayo relativos a las mediciones de respuesta con el control de agua limpia. Si no hay diferencias estadísticamente significativas entre el control de agua limpia y el control de disolvente para todas las variables de respuesta medidas, se deben determinar los parámetros del ensayo relativos a las mediciones de respuesta con una combinación de los controles de agua de dilución y disolvente.

*Grupos de tratamiento que llegan a la fase de desarrollo 60 y posteriores*

71. Tras la fase 60, los renacuajos presentan una reducción de tamaño y peso debido a la reabsorción de tejido y a la reducción de contenido absoluto de agua. Por ello, no se pueden utilizar adecuadamente las mediciones del peso húmedo y la SVL en los análisis estadísticos para establecer las diferencias en las tasas de crecimiento. Por consiguiente, los datos relativos al peso húmedo y a la longitud de los organismos en fases superiores a NF60 deben censurarse y no pueden utilizarse en los análisis de medias o medianas de las réplicas. Se pueden emplear dos planteamientos para analizar estos parámetros relativos al crecimiento.

72. Uno de los planteamientos consiste en tener en cuenta únicamente los renacuajos en fases de desarrollo iguales o inferiores a la fase 60 en relación con los análisis estadísticos del peso húmedo o la SVL. Se cree que este planteamiento proporciona información bastante sólida sobre la gravedad de los posibles efectos sobre el crecimiento, siempre que se retire de los análisis solo una pequeña proporción de los animales del ensayo ($\leq$ 20 %). Si presenta un desarrollo superior a la fase 60 una mayor cantidad de renacuajos ($\geq$ 20 %) a una o más concentraciones nominales, en ese caso debe realizarse un análisis ANOVA bifactorial con una estructura de varianza anidada en todos los renacuajos con el objeto de evaluar los efectos sobre el crecimiento derivados de los tratamientos con la sustancia, al tiempo que se tiene en cuenta el efecto del desarrollo en fases tardías en el crecimiento. El apéndice 3 proporciona orientación sobre el análisis ANOVA bifactorial del peso y de la longitud.

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2004), Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the detection of thyroid active substances: Phase 1 — Optimisation of the Test Protocol. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. N$^{o}$ 77, París.

▼**M6**

(2) OCDE (2007), Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2 — Multi-chemical Interlaboratory Study. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Nº 76. París.

(3) OCDE (2008), Report of the Validation Peer Review for the Amphibian Metamorphosis Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Nº 92. París.

(4) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Nº 23. París.

(5) ASTM (2002) Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. American Society for Testing and Materials, ASTM E E729-96 (2002), Filadelfia, Pensilvania.

(6) ASTM (2004) Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay — Xenopus (FETAX). E 1439-98.

(7) Kahl, M.D., Russom, C.L., DeFoe, D.L. and Hammermeister, D.E. (1999) Saturation units for use in aquatic bioassays. Chemosphere 39, pp. 539-551.

(8) Nieuwkoop, P.D. and Faber, J. (1994) Normal Table of Xenopus laevis. Garland Publishing, Nueva York.

(9) OCDE (2007), Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. Nº 82. París.

(10) Dodd, M.H.I. and Dodd, J.M. (1976) Physiology of Amphibia. Lofts, B. (ed.), Academic Press, Nueva York, pp. 467-599.

(11) OCDE (2006), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, Nº 54. París.

(12) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ, Pickford DB, 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp. 69–92.

▼M6

*Apéndice 1*

*Tabla 1*

**Condiciones experimentales del ensayo sobre metamorfosis de anfibios de veintiún días**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Animal de ensayo | | Larvas de *Xenopus laevis* | |
| Fase larval inicial | | Fase 51 de Nieuwkoop y Faber | |
| Periodo de exposición | | 21 días | |
| Criterios de selección de las larvas | | Fase de desarrollo y longitud total (opcional) | |
| Concentraciones de ensayo | | Mínimo de tres concentraciones que abarcan aproximadamente un orden de magnitud | |
| Régimen de exposición | | flujo dinámico (preferida) o renovación estática | |
| Caudal del sistema del ensayo | | 25 ml/min (sustitución completa del volumen aproximadamente cada 2,7 h) | |
| Parámetros principales / Días de determinación | | Mortalidad | Diariamente |
| | | Fase de desarrollo | D 7 y 21 |
| | | Longitud de las extremidades posteriores | D 7 y 21 |
| | | Distancia entre el hocico y la abertura cloacal | D 7 y 21 |
| | | Peso corporal húmedo | D 7 y 21 |
| | | Histología de la tiroides | D 21 |
| Agua de dilución / control de laboratorio | | Agua corriente desclorada (filtro de carbón) o fuente de laboratorio equivalente | |
| Densidad de larvas | | 20 larvas / recipiente de ensayo (5/l) | |
| Solución del ensayo / Recipiente de ensayo | | 4-10 l (10-15 cm de agua como mínimo) / Recipiente de ensayo de vidrio o acero inoxidable (por ejemplo, 22,5 × 14 × 16,5 cm) | |
| Replicación | | 4 recipientes de ensayo replicados / concentración y control del ensayo | |
| Tasa de mortalidad aceptable en los controles | | ≤ 10 % por recipiente de ensayo replicado | |
| Fijación de la tiroides | Número fijado | Todos los renacuajos (inicialmente se evalúan cinco por réplica) | |
| | Región | Cabeza o todo el cuerpo | |
| | Líquido de fijación | Fijador de Davidson | |
| Alimentación | Alimentos | Sera Micron® o equivalente | |
| | Cantidad/frecuencia | Véase la tabla 1 para consultar el régimen de alimentación con Sera Micron® | |
| Iluminación | Fotoperiodo | 12 h de luz: 12 h de oscuridad | |

▼**M6**

| | | |
|---|---|---|
| | Intensidad | De 600 a 2 000 lux (medición realizada en la superficie del agua) |
| Temperatura del agua | | 22° ± 1 °C |
| pH | | De 6,5 a 8,5 |
| Concentración de oxígeno disuelto (OD) | | > 3,5 mg/l (> 40 % de saturación de aire) |
| Programa de muestras de química analítica | | Una vez/semana (cuatro eventos de muestra/ensayo) |

▼M6

*Apéndice 2*

**Tablas informativas de datos brutos y datos resumidos**

*Tabla 1*

**Información general sobre la sustancia problema**

| Información sobre la sustancia | | | |
|---|---|---|---|
| | **Introduzca la sustancia problema, las unidades de concentración y los tratamientos** | | |
| | Sustancia problema: | | |
| | Unidades de concentración: | | |
| | Tratamiento 1 | | |
| | Tratamiento 2 | | |
| | Tratamiento 3 | | |
| | Tratamiento 4 | | |
| | | | |
| | Fecha (día 0): | | Introduzca la fecha (dd/mm/aa) |
| | Fecha (día 7): | | Introduzca la fecha (dd/mm/aa) |
| | Fecha (día 21): | | Introduzca la fecha (dd/mm/aa) |

*Tabla 2*

**Hojas de recopilación de datos brutos de los días 7 y 21**

**DÍA X**
**FECHA 00/00/00**

| | Concentración | Número de tratamiento | Número de réplica | Número de individuo | Identificador de individuo | Fase de desarrollo | Distancia SVL (mm) | Longitud de extremidades posteriores (mm) | Peso húmedo de todo el organismo (mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FILA | TTO | N$^{o}$ TTO | REP | IND | ID# | FASE | BL | HLL | PESO |
| 1 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 2 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 3 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 4 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 5 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 6 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 7 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 8 | 0,00 | 1 | | | | | | | |

▼**M6**

| | Concentración | Número de tratamiento | Número de réplica | Número de individuo | Identificador de individuo | Fase de desarrollo | Distancia SVL (mm) | Longitud de extremidades posteriores (mm) | Peso húmedo de todo el organismo (mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FILA | TTO | Nº TTO | REP | IND | ID# | FASE | BL | HLL | PESO |
| 9 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 10 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 11 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 12 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 13 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 14 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 15 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 16 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 17 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 18 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 19 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 20 | 0,00 | 1 | | | | | | | |
| 21 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 22 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 23 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 24 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 25 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 26 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 27 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 28 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 29 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 30 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 31 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 32 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 33 | 0,00 | 2 | | | | | | | |

▼**M6**

| | Concentración | Número de tratamiento | Número de réplica | Número de individuo | Identificador de individuo | Fase de desarrollo | Distancia SVL (mm) | Longitud de extremidades posteriores (mm) | Peso húmedo de todo el organismo (mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FILA | TTO | Nº TTO | REP | IND | ID# | FASE | BL | HLL | PESO |
| 34 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 35 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 36 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 37 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 38 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 39 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 40 | 0,00 | 2 | | | | | | | |
| 41 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 42 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 43 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 44 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 45 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 46 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 47 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 48 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 49 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 50 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 51 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 52 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 53 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 54 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 55 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 56 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 57 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 58 | 0,00 | 3 | | | | | | | |

▼**M6**

| | Concentración | Número de tratamiento | Número de réplica | Número de individuo | Identificador de individuo | Fase de desarrollo | Distancia SVL (mm) | Longitud de extremidades posteriores (mm) | Peso húmedo de todo el organismo (mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FILA | TTO | Nº TTO | REP | IND | ID# | FASE | BL | HLL | PESO |
| 59 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 60 | 0,00 | 3 | | | | | | | |
| 61 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 62 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 63 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 64 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 65 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 66 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 67 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 68 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 69 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 70 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 71 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 72 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 73 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 74 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 75 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 76 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 77 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 78 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 79 | 0,00 | 4 | | | | | | | |
| 80 | 0,00 | 4 | | | | | | | |

▼**M6**

*Tabla 3*

**Resúmenes calculados de los datos de los parámetros de los días 7 y 21**

| | | Fase de desarrollo | | | SVL (mm) | | Longitud extremidades posteriores (mm) | | Peso (mg) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| TTO | RÉP | MÍN | MEDIANA | MÁX | MEDIA | DESV TÍP | MEDIA | DESV TÍP | MEDIA | DESV TÍP |
| 1 | 1 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 1 | 2 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 1 | 3 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 1 | 4 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 2 | 1 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 2 | 2 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 2 | 3 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 2 | 4 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 3 | 1 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 3 | 2 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 3 | 3 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 3 | 4 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 4 | 1 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 4 | 2 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 4 | 3 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |
| 4 | 4 | 0 | #NUM! | 0 | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! | #DIV/0! |

*Nota:* Los cálculos de las celdas corresponden a las entradas de datos de la tabla 2.

*Tabla 4:*

**Datos de mortalidad diaria**

| Día del ensayo | Fecha | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 00/00/00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |

▼**M6**

| Día del ensayo | Fecha | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Recuento por réplicas | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Recuento por tratamientos | | 0 | | | | 0 | | | | 0 | | | | 0 | | | |

*Nota:* Los cálculos de las celdas corresponden a las entradas de datos de la tabla 1.

*Tabla 5*

**Criterios de calidad del agua**

| Sistema de exposición (renovación dinámica/estática): |
|---|
| Temperatura: |
| Intensidad de la luz: |
| Ciclo luz-oscuridad: |
| Alimentos: |
| Tasa de alimentación: |
| pH del agua: |
| Concentración de yodo en el agua del ensayo: |

▼**M6**

*Tabla 6*

**Resumen de datos químicos**

| Nombre de la sustancia: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nº CAS: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Día del ensayo | Fecha | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | 00/00/00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 20 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 21 | #Value! | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

*Nota:* Los cálculos de las celdas corresponden a las entradas de datos de la tabla 1.

▼**M6**

*Tabla 7*

**Tablas de notificación de histopatología para los criterios básicos**

Fecha: Sustancia: Anatomopatólogo:

| ID animal control — réplica 1 | ID animal control — réplica 2 | Hipertrofia de la glándula tiroidea | Atrofia de la glándula tiroidea | Hipertrofia de las células foliculares | Hiperplasia de las células foliculares |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Total: | | | | | |

| ID animal dosis — réplica 1 | ID animal dosis — réplica 2 | Hipertrofia de la glándula tiroidea | Atrofia de la glándula tiroidea | Hipertrofia de las células foliculares | Hiperplasia de las células foliculares |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Total: | | | | | |

| ID animal dosis — réplica 1 | ID animal dosis — réplica 2 | Hipertrofia de la glándula tiroidea | Atrofia de la glándula tiroidea | Hipertrofia de las células foliculares | Hiperplasia de las células foliculares |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Total: | | | | | |

| ID animal dosis — réplica 1 | ID animal dosis — réplica 2 | Hipertrofia de la glándula tiroidea | Atrofia de la glándula tiroidea | Hipertrofia de las células foliculares | Hiperplasia de las células foliculares |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| Total: | | | | | |

▼**M6**

*Tabla 8:*

**Criterios adicionales sobre histopatología**

Fecha: Sustancia: Anatomopatólogo:

| ID animal control — réplica 1 | ID animal control — réplica 2 | Aumento del área de la luz folicular | Reducción del área de la luz folicular |
|---|---|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Total: | | | |

| Animal dosis ID — réplica 1 | Animal de dosis ID — réplica 2 | Aumento del área de la luz folicular | Reducción del área de la luz folicular |
|---|---|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Total: | | | |

| ID animal dosis — réplica 1 | ID animal dosis — réplica 2 | Aumento del área de la luz folicular | Reducción del área de la luz folicular |
|---|---|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Total: | | | |

| ID animal dosis — réplica 1 | ID animal dosis — réplica 2 | Aumento del área de la luz folicular | Reducción del área de la luz folicular |
|---|---|---|---|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| Total: | | | |

▼**M6**

*Tabla 9*

**Descripciones explicativas de los hallazgos histopatológicos**

Fecha:

Sustancia:

Anatomopatólogo:

| | | Descripción explicativa |
|---|---|---|
| ID animal control — réplica 1 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| ID animal control — réplica 2 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| ID animal dosis — réplica 1 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| ID animal dosis — réplica 2 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

▼**M6**

| | | |
|---|---|---|
| ID animal dosis — réplica 1 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| ID animal dosis — réplica 2 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

| | | |
|---|---|---|
| ID animal dosis — réplica 1 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| ID animal dosis — réplica 2 | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

▼M6

*Tabla 10*

**Plantilla de tabla de resumen de presentación del día x (7 o 21) del AMA**

| | | Control | | | | Dosis 1 | | | | | Dosis 2 | | | | | Dosis 3 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Parámetro | Réplica | Media | DT | CV | N | Media | DT | CV | N | Valor p | Media | DT | CV | N | Valor p | Media | DT | CV | N | Valor p |
| **Longitud de la extremidad posterior (mm)** | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Media: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **SVL (mm)** | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Media: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **Peso húmedo (mg)** | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Media: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

▼M6

*Tabla 11*

**Plantilla de tabla de resumen de presentación de datos relativos a la fase de desarrollo del día × (7 o 21) del AMA**

| | | Control | | | | Dosis 1 | | | | | Dosis 2 | | | | | Dosis 3 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Réplica | Mediana | Mín | Máx | N | Mediana | Mín | Máx | N | Valor p | Mediana | Mín | Máx | N | Valor p | Mediana | Mín | Máx | Mediana | Valor p |
| **Fase de desarrollo** | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | 4 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Media: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

▼M6

*Apéndice 3*

**Análisis alternativo de peso y longitud en caso de desarrollo en fases tardías en más del 20 % de los renacuajos a una o más concentraciones**

Si una cantidad mayor de renacuajos presenta un desarrollo superior a la fase 60 (≥ 20 %) a una o más concentraciones nominales, en ese caso debe realizarse un análisis ANOVA bifactorial con una estructura de varianza anidada en todos los renacuajos con el objeto de evaluar los efectos en el crecimiento derivados del tratamiento con la sustancia, al tiempo que se tiene en cuenta el efecto del desarrollo en fases tardías en el crecimiento.

La propuesta consiste en utilizar todos los datos, pero teniendo en cuenta el efecto del desarrollo en fases tardías. Esto se puede llevar a cabo con un análisis ANOVA de dos factores, con una estructura de varianza anidada. Defina Fase tardía = «Sí» de un animal si su fase de desarrollo es la 61 o posterior. En caso contrario, defina Fase tardía = «No». A continuación se puede llevar a cabo un análisis ANOVA bifactorial (concentración y fase tardía, y su interacción), con Rep(Conc) como un factor aleatorio y Renacuajo(Rep) como otro efecto aleatorio. Este sigue tratando la réplica como la unidad de análisis y aporta básicamente los mismos resultados que un análisis ponderado de medias de réplica*fase tardía, ponderado con el número de animales por media. Si los datos no cumplen los requisitos de homogeneidad de la varianza o de normalidad de ANOVA, se puede llevar a cabo una transformación normalizada ordinal por rangos para eliminar esa objeción.

Además de las pruebas F de ANOVA clásico para analizar los efectos de Conc, Fase tardía y sus interacciones, la prueba F de interacción se puede «dividir» en dos pruebas F de ANOVA adicionales, una sobre las respuestas medias en las concentraciones de Fase tardía = «No» y otra sobre las respuestas medias en las concentraciones de Fase tardía = «Sí». En cada nivel de Fase tardía se realizan más comparaciones de las medias de tratamiento con respecto al control. Se puede llevar a cabo un análisis de tendencia con comparaciones por pares simples o con contrastes adecuados si hay indicios de una relación dosis-respuesta no monótona dentro de un nivel de la variable Fase tardía. Se realiza un ajuste Bonferroni-Holm a los valores p solo si el corte F correspondiente no es significativo. Esto se puede realizar con SAS y, supuestamente, con otros paquetes de programas estadísticos. Pueden surgir complicaciones cuando no haya animales en fase tardía en algunas concentraciones, pero estas situaciones se pueden gestionar de forma muy sencilla.

▼**M6**

*Apéndice 4*

**Definiciones**

**Sustancia::** sustancia o mezcla.

**Sustancia problema::** toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M6

## C.39. ENSAYO SOBRE LA REPRODUCCIÓN DE COLÉMBOLOS EN EL SUELO

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 232 de la OCDE (2009). Este método de ensayo se ha diseñado para evaluar los efectos de las sustancias en el resultado reproductor de los colémbolos en el suelo. Está basado en procedimientos existentes (1) (2). Las especies *Folsomia candida* partenogenética y la *Folsomia fimetaria* de reproducción sexual son dos de las más accesibles de los colémbolos, las cuales se pueden cultivar y están disponibles comercialmente. Cuando hay que evaluar hábitats específicos no cubiertos por las dos especies, el procedimiento también se puede ampliar a otras especies de colémbolos si cumplen los criterios de validez del ensayo.

2. Los colémbolos que viven en el suelo son especies ecológicamente relevantes para ensayos ecotoxicológicos. Los colémbolos son hexápodos con un exoesqueleto delgado y muy permeable al aire y al agua, y representan especies de artrópodos con una ruta y una tasa de exposición distintas en comparación con las lombrices de tierra y los enquitreidos.

3. Las densidades de población de los colémbolos suelen llegar a $10^5$ $m^{-2}$ en el suelo y en capas de detritus de hojarasca de muchos ecosistemas terrestres (3) (4). Los adultos miden típicamente entre 0,5 y 5 mm, y su contribución a la respiración y la biomasa animal total del suelo es baja, se estima que oscila entre el 1 % y el 5 % (5). Por lo tanto, es posible que su función más importante sea la de reguladores potenciales de procesos mediante la depredación de microorganismos y microfauna. Los colémbolos son presas de una gran variedad de invertebrados endogeicos y epigeicos, como ácaros, ciempiés, arañas, carábidos y estafilínidos. Los colémbolos contribuyen a los procesos de descomposición de los suelos ácidos, donde tal vez sean los invertebrados del suelo más importantes, aparte de los enquitreidos, ya que las lombrices de tierra y los diplópodos suelen estar ausentes.

4. *F. fimetaria* tiene una distribución mundial y es común en varios tipos de suelo, desde suelos arenosos hasta suelos francos y de mull a mor. Se trata de un colémbolo sin ojos ni pigmentos. Se ha registrado su presencia en suelos agrícolas de toda Europa (6). Presenta un hábito de alimentación omnívora, que incluye entre sus alimentos hifas fúngicas, bacterias, protozoos y detritus. Interactúa por su alimentación con las infecciones de hongos patógenos de las plantas (7) y puede afectar a las micorrizas, como se sabe que sucede con *F. candida*. Como la mayor parte de las especies de colémbolos, se reproducen sexualmente, lo que exige la presencia permanente de machos para la fertilización de los huevos.

5. *F. candida* también se distribuye por todo el mundo. Aunque no es frecuente en la mayoría de los suelos naturales, suele aparecer en grandes cantidades en las zonas ricas en humus. Se trata de un colémbolo sin ojos ni pigmentos. Cuenta con una furca (órgano para saltar) bien desarrollada, un movimiento de carrera activo y salta fácilmente si se le molesta. La función ecológica de *F. candida* es similar a la función de la *F. fimetaria*, pero los hábitats son suelos más ricos en materia orgánica. Se reproduce partenogenéticamente. Los machos pueden aparecer en una proporción de menos de 1 por mil.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

6. Se exponen colémbolos adultos (*F. fimetaria*) o juveniles (*F. candida*) sincrónicos a un intervalo de concentraciones de la sustancia problema mezclada con un suelo artificial modificado (8) y un contenido en materia orgánica del 5 % (o un suelo alternativo). El escenario del ensayo se puede dividir en dos pasos:

— En los casos en que no haya suficiente información disponible sobre la toxicidad, un estudio de determinación del intervalo en el que la mortalidad

▼M6

y la reproducción sean los principales parámetros que se evalúen transcurridas dos semanas en el caso de *F. fimetaria* y tres semanas en el caso de *F. candida*.

— Un ensayo de reproducción definitivo en el que se evalúe el número total de juveniles producido por los animales parentales, así como la supervivencia de estos. La duración de este ensayo definitivo es de tres semanas para *F. fimetaria* y de cuatro semanas para *F. candida*.

El efecto tóxico de la sustancia problema en la mortalidad y el resultado reproductor de los adultos se expresa como $LC_x$ y $EC_x$, ajustando los datos a un modelo adecuado mediante regresión no lineal con el fin de estimar la concentración que provocaría un x % de mortalidad o de reducción en el resultado reproductor, respectivamente; o bien de manera alternativa como valor NOEC/LOEC (9).

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

7. Preferiblemente, deberían conocerse las propiedades físicas, la hidrosolubilidad, el log $K_{ow}$, el coeficiente de reparto agua/suelo y la presión de vapor de la sustancia problema. Sería deseable contar con información adicional sobre el destino de la sustancia problema en el suelo, como los índices de fotólisis e hidrólisis y la degradación biótica. Cuando estén disponibles, deben documentarse la identificación química de la sustancia problema conforme a la nomenclatura de la IUPAC, el número de registro CAS, el lote de fabricación, el lote de acondicionamiento, la fórmula estructural y la pureza.

8. Este método de ensayo puede utilizarse con sustancias solubles o insolubles en el agua. Sin embargo, el modo de aplicación de la sustancia problema variará en consecuencia. El método de ensayo no es aplicable a sustancias volátiles, es decir, sustancias cuya constante de Henry o cuyo coeficiente de reparto aire/agua son superiores a uno, o sustancias cuya presión de vapor es superior a 0,0133 Pa a 25 °C.

VALIDEZ DEL ENSAYO

9. Deberán cumplirse los criterios siguientes en los controles no tratados para que un resultado del ensayo pueda considerarse válido:

— la mortalidad media de los adultos no debe superar el 20 % al final del ensayo;

— el número medio de juveniles por recipiente debe ser, como mínimo, de cien al final del ensayo; y

— el coeficiente de variación calculado para el número de juveniles debe ser inferior al 30 % al final del ensayo definitivo.

SUSTANCIA DE REFERENCIA

10. Debe analizarse una sustancia de referencia a su concentración $EC_{50}$ para el tipo de suelo elegido para el ensayo, a intervalos regulares o posiblemente en paralelo con cada serie de ensayo con el objeto de comprobar si la respuesta de los organismos de ensayo en el sistema de ensayo se encuentra en el nivel normal. Una sustancia de referencia adecuada es el ácido bórico, que debe reducir la reproducción en un 50 % (10) (11) a alrededor de 100 mg/kg de peso seco de suelo para ambas especies.

DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

**Recipientes y equipo del ensayo**

11. Son recipientes adecuados para el ensayo los que puedan albergar 30 g de suelo húmedo. El material debe ser vidrio o plástico inerte (no tóxico). Sin embargo, debe evitarse el uso de recipientes de plástico si la exposición a la sustancia problema se reduce debido a la sorción. Los recipientes de ensayo deben contar con una sección transversal que permita que la profundidad

▼M6

real del suelo en cuestión en el interior del recipiente de ensayo sea de 2 a 4 cm. Los recipientes deben contar con tapas (por ejemplo, de vidrio o polietileno) diseñadas para reducir la evaporación del agua al tiempo que permitan el intercambio de gases entre el suelo y la atmósfera. El recipiente debe ser, como mínimo, parcialmente transparente para permitir la transmisión de la luz.

12. Se precisa un equipo normal de laboratorio y, en particular el siguiente:

— estufa secadora;

— estereomicroscopio;

— pH-metro y luxómetro;

— balanzas de precisión adecuada;

— equipo adecuado para controlar la temperatura;

— equipo adecuado para controlar la humedad del aire (no es esencial si los recipientes de ensayo están cubiertos con tapas);

— incubadora o pequeña sala con control de temperatura;

— pinzas o dispositivo de flujo de aire con baja succión.

**Preparación del suelo del ensayo**

13. Se utiliza un suelo artificial modificado (8) con un contenido en materia orgánica del 5 %. También puede utilizarse un suelo natural, ya que el suelo artificial no se parece a los suelos naturales. La composición recomendada del suelo artificial es la siguiente (basándose en pesos secos, secado hasta peso constante a 105 °C):

— 5 % de turba esfágnea, secada al aire y triturada finamente (es aceptable un tamaño de partícula de 2 ± 1 mm);

— 20 % de caolín (con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %);

— aproximadamente un 74 % de arena industrial secada al aire (en función de la cantidad de $CaCO_3$ necesaria), arena predominantemente fina con más de un 50 % de partículas de entre 50 y 200 micras. La cantidad exacta de arena depende de la cantidad de $CaCO_3$ (véase más adelante) y, en conjunto, deben sumar un 75 %.

— 1,0 % de carbonato cálcico ($CaCO_3$, pulverizado, de grado analítico) para obtener un pH de 6,0 ± 0,5; la cantidad de carbonato cálcico que se debe añadir dependerá principalmente de la calidad o el tipo de turba (véase la nota 1).

*Nota 1:* La cantidad de $CaCO_3$ necesaria dependerá de los componentes del sustrato del suelo y debe determinarse midiendo inmediatamente antes del ensayo el pH de submuestras de suelo húmedo preincubadas.

*Nota 2:* Se recomienda medir el pH y, opcionalmente, la relación C/N, la capacidad de intercambio catiónico (CEC) y el contenido en materia orgánica del suelo para permitir la normalización en una fase posterior y mejorar la interpretación de los resultados.

*Nota 3:* En caso necesario, por ejemplo para fines específicos del ensayo, los suelos naturales de lugares no contaminados también pueden utilizarse como sustrato de ensayo o cultivo. No obstante, si se utiliza suelo natural, debe caracterizarse al menos por el origen (lugar de recogida), el pH, la textura (granulometría), la CEC y el contenido en materia orgánica, además de tener que estar libre de toda contaminación. En el caso del suelo natural, es aconsejable demostrar su idoneidad para el ensayo y para cumplir los criterios de validez del ensayo antes de utilizarlo en un ensayo definitivo.

▼M6

14. Los componentes secos del suelo se mezclan concienzudamente (por ejemplo, en un mezclador de laboratorio de gran escala). La capacidad de retención de agua máxima (WHC) del suelo artificial se determina de conformidad con los procedimientos descritos en el apéndice 5. El contenido de humedad del suelo del ensayo debe optimizarse para conseguir una estructura de suelo poroso suelto que permita la entrada de los colémbolos en los poros. Normalmente, corresponde a una banda entre el 40 y el 60 % de la WHC máxima.

15. Para equilibrar o estabilizar la acidez, el suelo artificial seco se humedece previamente añadiendo suficiente agua desionizada para obtener aproximadamente la mitad del contenido de agua final entre 2 y 7 días antes de que comience el ensayo. Para determinar el pH, se utiliza una mezcla de suelo y cloruro potásico (KCl) 1 M, o una solución 0,01 M de cloruro cálcico ($CaCl_2$) en una relación de 1:5 (de acuerdo con el apéndice 6). Si el suelo es más ácido que el intervalo requerido, se puede ajustar añadiendo una cantidad adecuada de $CaCO_3$. Si el suelo es demasiado alcalino, se puede ajustar añadiendo un ácido inorgánico inofensivo para los colémbolos.

16. El suelo humedecido previamente se divide en un número de partes equivalente al número de concentraciones de ensayo (más la sustancia de referencia, cuando proceda) y de controles utilizados en el ensayo. Se añaden las sustancias problema y se ajusta el contenido de agua de acuerdo con el punto 24.

**Selección y preparación de los animales del ensayo**

17. *F. candida* partenogenética es la recomendada, ya que en el ensayo interlaboratorios del método de ensayo (11) esta especie cumplió los criterios de validez con respecto a la supervivencia con mayor frecuencia que *F. fimetaria*. Si se utiliza otra especie, debe cumplir los criterios de validez que figuran en el punto 9. Al inicio del ensayo, los animales deben estar bien alimentados y tener una edad de 23 a 26 días, en lo que respecta a *F. fimetaria*, y entre 9 y 12 días en lo que respecta a *F. candida*. En cada réplica, el número de *F. fimetaria* debe ser de 10 machos y 10 hembras; en el caso de *F. candida*, deben utilizarse 10 hembras (véanse los apéndices 2 y 3). Los animales sincrónicos se seleccionan de forma aleatoria de las placas y se comprueba el estado de salud y físico de cada lote que se añade a una réplica. Cada grupo de 10 o 20 individuos se añade a un recipiente de ensayo seleccionado de forma aleatoria, y se seleccionan las hembras de gran tamaño de *F. fimetaria* para garantizar una distinción adecuada de los machos de *F. fimetaria*.

**Preparación de las concentraciones de ensayo**

18. Se pueden utilizar cuatro métodos de aplicación de la sustancia problema: 1) introducir la sustancia problema en el suelo con agua como vehículo; 2) introducir la sustancia problema en el suelo con un disolvente orgánico como vehículo; 3) introducir la sustancia problema en el suelo con arena como vehículo; o 4) aplicar la sustancia problema en la superfície del suelo. La selección del método adecuado depende de las características de la sustancia y de la finalidad del ensayo. En general, se recomienda introducir la sustancia problema en el suelo. No obstante, pueden ser necesarios procedimientos de aplicación coherentes con el uso práctico de la sustancia problema (por ejemplo, la pulverización de una fórmula líquida o el uso de fórmulas de plaguicidas especiales, como preparaciones para semillas o gránulos). El suelo se trata antes de añadir los colémbolos, salvo cuando se añade la sustancia problema a la superficie del suelo; se debe permitir que los colémbolos entren en el suelo.

*Sustancia problema soluble en agua*

19. Se prepara una solución de la sustancia problema en agua desionizada, en una cantidad suficiente para realizar todas las réplicas de una concentración de ensayo. Cada solución de la sustancia problema se mezcla bien con un solo lote de suelo humedecido previamente antes de introducirse en el recipiente de ensayo.

*Sustancia problema insoluble en agua*

20. En lo que respecta a las sustancias insolubles en agua, pero solubles en disolventes orgánicos, la sustancia problema puede disolverse en el volumen más pequeño posible de un disolvente adecuado (por ejemplo, acetona) que siga garantizando la mezcla correcta de la sustancia en el suelo y su mezcla con una parte de la arena de cuarzo necesaria. Solo deben utilizarse disolventes volátiles. Cuando se utilice un disolvente orgánico, todas las concentraciones de ensayo y un control negativo de disolvente adicional deben

▼M6

contener la misma cantidad mínima de disolvente. Los recipientes de aplicación deben permanecer destapados durante un periodo determinado para permitir que el disolvente asociado a la aplicación de la sustancia problema se evapore, velando por que la sustancia problema no se disipe durante este periodo.

*Sustancia problema poco soluble en agua y en disolventes orgánicos*

21. En lo que respecta a las sustancias poco solubles en agua y en disolventes orgánicos, se mezcla arena de cuarzo, que debe formar parte de la arena total añadida al suelo, con la cantidad de la sustancia problema necesaria para obtener la concentración de ensayo deseada. Esta mezcla de arena de cuarzo y de sustancia problema se añade al suelo previamente humedecido y se mezcla bien tras añadir una cantidad adecuada de agua desionizada para obtener la humedad necesaria. La mezcla final se divide entre los recipientes de ensayo. El procedimiento se repite con cada concentración del ensayo y se prepara también un control adecuado.

*Aplicación de la sustancia problema en la superficie del suelo*

22. Si la sustancia problema es un plaguicida, podría resultar adecuado aplicarla en la superficie del suelo mediante pulverización. El suelo se trata después de añadir los colémbolos. Los recipientes de ensayo se llenan en primer lugar con el sustrato del suelo humedecido, se añaden los animales y, a continuación, se pesan los recipientes de ensayo. Para evitar toda exposición directa de los animales a la sustancia problema mediante un contacto directo, la sustancia problema se aplica como mínimo media hora después de introducir los colémbolos. La sustancia problema debe aplicarse en la superficie del suelo de la manera más uniforme posible con ayuda de un dispositivo de pulverización adecuado a escala de laboratorio para simular la aplicación por pulverización sobre el terreno. La aplicación debe producirse a una temperatura determinada con ± 2 °C de variación y, en lo que respecta a las soluciones, emulsiones o dispersiones acuosas, con una tasa de aplicación de agua conforme a las recomendaciones de la evaluación de riesgos. Esta tasa debe comprobarse con una técnica de calibración adecuada. Las fórmulas especiales, como la preparación para semillas o los gránulos, pueden aplicarse de acuerdo con el uso agrícola. El alimento se añade después de la pulverización.

PROCEDIMIENTO

**Condiciones de ensayo**

23. La temperatura media del ensayo debe ser de 20 ± 1 °C con un intervalo de temperatura de 20 ± 2 °C. El ensayo se lleva a cabo con ciclos controlados de luz-oscuridad (preferiblemente, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) con una iluminación de 400 a 800 lux en el área de los recipientes de ensayo.

24. A fin de comprobar la humedad del suelo, los recipientes se pesan al principio, a la mitad y al final del ensayo. Las pérdidas de peso superiores al 2 % se reponen añadiendo agua desionizada. Cabe señalar que la pérdida de agua puede reducirse manteniendo un alto nivel de humedad ambiental (superior al 80 %) en la incubadora del ensayo.

25. El pH debe medirse al principio y al final del estudio de determinación del intervalo y del ensayo definitivo. Las mediciones deben realizarse con una muestra extra de control y con una muestra extra de las muestras de suelo tratado (todas las concentraciones) que se habrán preparado y mantenido de la misma forma que los cultivos del ensayo, pero sin añadir colémbolos.

**Procedimiento y mediciones del ensayo**

26. Para cada concentración de ensayo, se coloca en el recipiente de ensayo una cantidad de suelo de ensayo correspondiente a 30 g de peso en fresco. También se preparan controles de agua, sin la sustancia problema. Si se utiliza un vehículo para aplicar la sustancia problema, debe analizarse una

▼M6

serie de control que contenga solo el vehículo, además de la serie del ensayo. La concentración de disolvente o dispersante ha de ser igual a la utilizada en los recipientes de ensayo que contienen la sustancia problema.

27. Los distintos ejemplares de colémbolos se trasladan con cuidado a cada recipiente de ensayo (se asignan aleatoriamente a los recipientes de ensayo) y se colocan en la superficie del suelo. Para trasladar los animales de forma eficaz, se puede utilizar un dispositivo de flujo de aire de baja succión. El número de réplicas de las concentraciones de ensayo y de los controles depende del diseño de ensayo que se utilice. Los recipientes de ensayo se colocan aleatoriamente en la incubadora del ensayo y estas posiciones se vuelven a aleatorizar cada semana.

28. En lo que respecta a los veinte adultos del ensayo con *F. fimetaria*, se deben utilizar 10 machos y 10 hembras de entre 23 y 26 días de edad por cada recipiente de ensayo. El día 21 se extraen los colémbolos del suelo y se cuentan. En lo que respecta a *F. fimetaria*, el sexo se discrimina por tamaño en el lote de animales sincronizado que se utiliza para el ensayo. Las hembras son claramente más grandes que los machos (véase el apéndice 3).

29. En lo que respecta al ensayo con *F. candida*, deben utilizarse juveniles de entre 9 y 12 días por cada recipiente de ensayo. El día 28 se extraen los colémbolos de la tierra y se cuentan.

30. Como fuente de alimentos adecuada, se añade a cada recipiente una cantidad suficiente, por ejemplo de 2-10 mg, de levadura granulada seca de panadería para uso doméstico disponible en el mercado, al principio del ensayo y una vez transcurridas dos semanas aproximadamente.

31. Al final del ensayo se evalúan la mortalidad y la reproducción. Transcurridas tres (*F. fimetaria*) o cuatro semanas (*F. candida*), se extraen los colémbolos del suelo de ensayo (véase el apéndice 4) y se cuentan (12). Un colémbolo se registra como muerto si no está presente en la extracción. El proceso de extracción y el de recuento deben validarse. La validez implica una eficacia de extracción de juveniles superior al 95 %, por ejemplo, añadiendo un número conocido al suelo.

32. En el apéndice 2 se incluyen un resumen práctico y el calendario de los procedimientos del ensayo.

**Diseño del ensayo**

*Ensayo de determinación del intervalo*

33. Cuando sea necesario, se realiza un ensayo de determinación del intervalo con, por ejemplo, cinco concentraciones de la sustancia problema de 0,1, 1,0, 10, 100 y 1 000 mg/kg de peso seco de suelo, y dos réplicas de cada tratamiento y control. La información adicional procedente de ensayos con sustancias similares o de publicaciones sobre mortalidad o reproducción de los colémbolos también podría resultar útil para decidir el intervalo de concentraciones que debe utilizarse en el ensayo de determinación del intervalo.

34. La duración del ensayo de determinación del intervalo es de dos semanas con *F. fimetaria* y de tres semanas con *F. candida*, para garantizar que se produzca una sola eclosión de juveniles. Al final del ensayo se evalúan la mortalidad y la reproducción de los colémbolos. Debe registrarse el número de adultos y la aparición de juveniles.

*Ensayo definitivo*

35. Para determinar la $EC_x$ (por ejemplo, $EC_{10}$, $EC_{50}$), deben analizarse doce concentraciones. Se recomiendan, como mínimo, dos réplicas para cada tratamiento de concentración del ensayo y seis réplicas de control. El factor de separación puede variar en función del patrón dosis-respuesta.

▼M6

36. Para determinar la NOEC/LOEC, deben analizarse al menos cinco concentraciones en una serie geométrica. Se recomiendan cuatro réplicas de cada tratamiento de concentración del ensayo más ocho controles. Las concentraciones deben estar separadas por un factor no superior a 1,8.

37. Un planteamiento combinado permite determinar tanto la NOEC/LOEC como la ECx. En lo que respecta a este planteamiento combinado, deben utilizarse ocho concentraciones de tratamiento en una serie geométrica. Se recomiendan cuatro réplicas de cada tratamiento más ocho controles. Las concentraciones deben estar separadas por un factor no superior a 1,8.

38. Si no se observan efectos a la concentración más alta de la prueba de determinación del intervalo (es decir, 1 000 mg/kg), el ensayo de reproducción puede llevarse a cabo como prueba límite, utilizando una concentración de ensayo de 1 000 mg/kg y el control. Una prueba límite brindará la oportunidad de demostrar que no se produce ningún efecto estadísticamente significativo a la concentración límite. Deben utilizarse ocho réplicas tanto con el suelo tratado como con el control.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

39. El resultado reproductor es el parámetro principal (por ejemplo, el número de juveniles producidos por recipiente de ensayo). El análisis estadístico, por ejemplo con los procedimientos ANOVA, compara los tratamientos mediante la prueba t de Student, la prueba de Dunnett o la prueba de Williams. Se calculan intervalos de confianza del 95 % para las medias de cada tratamiento.

40. El número de adultos supervivientes en los controles no tratados constituye un importante criterio de validez y debe quedar documentado. Al igual que en la prueba de determinación del intervalo, el resto de signos perjudiciales también debe registrarse en el informe final.

*$LC_x$ y $EC_x$*

41. Los valores de $EC_x$, incluyendo sus límites de confianza del 95 % inferior y superior para el parámetro, se calculan con métodos estadísticos adecuados (por ejemplo, función logística o de Weibull, método de Spearman-Karber recortado o la interpolación simple). El valor de $EC_x$ se obtiene insertando un valor correspondiente al x % de la media del control en la ecuación determinada. Para calcular el valor $EC_{50}$ o cualquier otro valor de $EC_x$, todo el conjunto de datos debe someterse a un análisis de regresión. El valor de $LC_{50}$ se estima habitualmente mediante un análisis de probit o similar que tiene en cuenta los datos de mortalidad con distribución binomial.

*NOEC/LOEC*

42. Si un análisis estadístico tiene por objeto determinar la NOEC/LOEC, son necesarias las estadísticas por recipiente (los recipientes individuales se consideran réplicas). Deben utilizarse métodos estadísticos adecuados de conformidad con el Documento 54 de la OCDE relativo a los enfoques actuales del análisis estadístico de datos sobre ecotoxicidad: guía de aplicación (9). En general, los efectos adversos de la sustancia problema en comparación con los del control se analizan mediante pruebas de hipótesis unilaterales, para $p \leq 0,05$.

43. La distribución normal y la homogeneidad de la varianza pueden evaluarse con una prueba estadística adecuada; por ejemplo, la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene, respectivamente ($p \leq 0,05$). Se pueden llevar a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y pruebas posteriores

▼M6

de comparaciones múltiples. Las pruebas de comparaciones múltiples (por ejemplo, la prueba de Dunnett) o las pruebas de ajuste secuencial (por ejemplo, la prueba de Williams) se pueden utilizar para calcular si hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los controles y las diversas concentraciones de la sustancia problema [la selección de la prueba recomendada debe ser conforme con el Documento 54 de la OCDE (9)]. De lo contrario, se pueden utilizar métodos no paramétricos (por ejemplo, la prueba de U de Bonferroni de acuerdo con la prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra) para determinar la NOEC y la LOEC.

*Ensayo límite*

44. Si se ha realizado un ensayo límite (comparación solo del control y de un tratamiento) y se cumplen los requisitos previos de los procedimientos de pruebas paramétricas (normalidad, homogeneidad), se pueden evaluar las respuestas métricas con la prueba de Student (prueba t). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse la prueba t de varianzas desiguales (prueba t de Welch) o una prueba no paramétrica, como la prueba U de Mann-Whitney.

45. Para determinar las diferencias significativas entre los controles (control y control de disolvente), se pueden analizar las réplicas de cada control, tal y como se describen para el ensayo límite. Si estas pruebas no detectan diferencias significativas, se pueden combinar todas las réplicas de control y de control de disolvente. De lo contrario, todos los tratamientos deben compararse con el control de disolvente.

**Informe del ensayo**

46. El informe del ensayo debe incluir, como mínimo, la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— identidad de la sustancia problema, lote de fabricación, lote de acondicionamiento y número CAS y pureza;

— propiedades fisicoquímicas de la sustancia problema (por ejemplo, log $K_{ow}$, hidrosolubilidad, presión de vapor, constante de Henry (H) y, preferiblemente, información sobre el destino de la sustancia problema en el suelo), si estuvieran disponibles;

— se deben especificar la fórmula de la sustancia problema y de los aditivos si no se va a analizar la sustancia pura.

*Organismos de ensayo:*

— identificación de la especie y proveedor de los organismos de ensayo, descripción de las condiciones de cría e intervalo de edad de los organismos de ensayo.

*Condiciones de ensayo:*

— descripción del diseño experimental y del procedimiento;

— información detallada sobre la preparación del suelo de ensayo, especificaciones detalladas si se utiliza suelo natural (origen, historial, granulometría, pH, contenido en materia orgánica);

— capacidad de retención de agua del suelo;

— descripción de la técnica utilizada para aplicar la sustancia problema al suelo;

— condiciones de ensayo: intensidad de la luz, duración de los ciclos de luz-oscuridad, temperatura;

— descripción del régimen de alimentación, tipo y cantidad del alimento utilizado en el ensayo, fechas de alimentación;

— pH y contenido de agua del suelo al principio y al final del ensayo (control y cada tratamiento);

— descripción detallada del método de extracción y de la eficacia de la extracción.

▼M6

*Resultados de los ensayos*

— número de juveniles determinado en cada recipiente de ensayo al final del ensayo;

— número de adultos y su mortalidad (%) en cada recipiente de ensayo al final del ensayo;

— descripción de síntomas fisiológicos o patológicos obvios o cambios de comportamiento distintivos;

— resultados obtenidos con la sustancia de referencia.

— valores de NOEC/LOEC, $LC_x$ de la mortalidad y $EC_x$ de la reproducción (en su mayoría, $LC_{50}$, $LC_{10}$, $EC_{50}$ y $EC_{10}$) junto con los intervalos de confianza del 95 %; un gráfico del modelo ajustado que se haya usado en los cálculos, su ecuación de función y sus parámetros [véase (9)];

— toda la información y las observaciones útiles para la interpretación de los resultados;

— potencia del ensayo real si se realizan pruebas de hipótesis (9);

— desviaciones de los procedimientos descritos en este método de ensayo y cualquier suceso inusual durante el mismo;

— validez del ensayo;

— en lo que respecta a la NOEC, cuando se realice una estimación, la diferencia detectable mínima.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Wiles JA and Krogh PH (1998). Testing with the collembolans *I. viridis*, *F. candida* and *F. fimetaria*. In Handbook of soil invertebrate toxicity tests (ed. H Løkke and CAM Van Gestel), pp. 131-156. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester

(2) ISO (1999). Calidad del suelo. Inhibición de la reproducción de Collembola (*Folsomia candida*) por contaminantes del suelo. Nº 11267. Organización Internacional de Normalización, Ginebra.

(3) Burges A and Raw F (Eds) (1967) Soil Biology. Academic Press. Londres.

(4) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287-388.

(5) Petersen H (1994). A review of collembolan ecology in ecosystem context. Acta Zoologica Fennica 195: 111-118.

(6) Hopkin SP (1997). *Biology of the Springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press. 330 pp. (ISBN 0-19-854084-1).

(7) Ulber B (1983). Einfluss von *Onychirurus fimatus* Gisin (Collembola, Onychiuridae) und *Folsomia fimetaria* L. (Collembola, Isotomidae) auf *Pythium ultimum* Trow. einen Erreger des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. In New trends in soil Biology (Lebrun Ph, André HM, De Medts A, Grégoire-Wibo, Wauthy G (Eds), Proceedings of the VI. international colloquium on soil zoology, Louvain-la-Neuve (Bélgica), 30 de agosto - 2 de septiembre de 1982, I Dieu-Brichart, Ottignies-Louvain-la-Neuve, pp. 261-268.

(8) Capítulo C.36 del presente anexo. *Ensayo de reproducción de un ácaro predador* (Hypoaspis (Geolaelaps) aculeifer) *en el suelo.*

(9) OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application. OECD series on testing and assessment Number 54, ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, París.

(10) Scott-Fordsmand JJ and Krogh PH (2005) Background report on prevalidation of an OECD springtail test guideline. Environmental Project Nº 986. Miljøstyrelsen 61 pp. Ministerio de Medio Ambiente de Dinamarca.

▼**M6**

(11) Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Agencia de Protección del Medio Ambiente de Dinamarca, Proyecto de Medio Ambiente nº 1256, pp. 66.

(12) Krogh PH, Johansen K and Holmstrup M (1998). Automatic counting of collembolans for laboratory experiments. Appl. Soil Ecol. 7, 201-205.

(13) Fjellberg A (1980). Identification keys to Norwegian collembolans. Norsk Entomologisk Forening.

(14) Edwards C.A. (1955). Simple techniques for rearing Collembola, Symphyla and other small soil inhabiting arthropods. In Soil Zoology (Kevan D.K. McE., Ed). Butterworths, Londres, pp. 412-416.

(15) Goto HE (1960) Simple techniques for the rearing of Collembola and a not on the use of a fungistatic substance in the cultures. Entomologists' Monthly Magazine 96:138-140.

▼M6

*Apéndice 1*

**DEFINICIONES**

Las definiciones siguientes son aplicables a este método de ensayo (en este ensayo, todas las concentraciones con efecto se expresan en forma de masa de sustancia problema por masa seca del suelo de ensayo):

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**NOEC (concentración sin efecto observado)**: concentración de la sustancia problema con la que no se observan efectos. En este ensayo, la concentración correspondiente a la NOEC no presenta ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en un periodo de exposición determinado en comparación con el control.

**LOEC (concentración mínima con efecto observado)**: concentración más baja de la sustancia problema que presenta un efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en un periodo de exposición determinado en comparación con el control.

**$EC_x$ (concentración con efecto del x %)**: concentración que provoca un x % de un efecto en los organismos de ensayo dentro de un periodo de exposición determinado en comparación con el control. Por ejemplo, una $EC_{50}$ es una concentración que se ha estimado que provoca un efecto en un parámetro del ensayo en el 50 % de una población expuesta durante un periodo de exposición determinado.

**Sustancia problema**: cualquier sustancia o mezcla que se haya analizado con este método de ensayo.

▼M6

*Apéndice 2*

**Acciones principales y calendario para realizar un ensayo con colémbolos**

Los pasos del ensayo se pueden resumir de la siguiente manera:

| Tiempo (día) | Acción |
|---|---|
| De – 23 a – 26 | Preparar cultivo sincrónico de *F. fimetaria* |
| -14 | Preparar suelo artificial (mezcla de componentes secos)<br>Verificar el pH del suelo artificial y ajustar según convenga<br>Medir la WHC máxima del suelo |
| De – 9 a – 12 | Preparar cultivo sincrónico de *F. candida* |
| De – 2 a – 7 | Prehumedecer el suelo. |
| – 1 | Distribuir los juveniles en lotes<br>Preparar las soluciones madre y aplicar la sustancia problema si se requiere disolvente |
| 0 | Preparar las soluciones madre y aplicar la sustancia problema si se trata de una sustancia sólida hidrosoluble, o si se quiere una aplicación superficial<br>Medir el pH del suelo y pesar los recipientes<br>Añadir alimento; introducir los colémbolos |
| 14 | Ensayo de determinación del intervalo de *F. fimetaria*: finalizar el ensayo, extraer los animales, medir el pH del suelo y la pérdida de agua (peso)<br>Ensayos definitivos: medir el contenido de humedad y reponer agua, y añadir 2-10 mg de levadura |
| 21 | Ensayo definitivo de *F. fimetaria*: finalizar el ensayo, extraer los animales, medir el pH del suelo y la pérdida de agua (peso);<br>Ensayo de determinación del intervalo de *F. candida*: finalizar el ensayo, extraer los animales, medir el pH del suelo y la pérdida de agua (peso). |
| 28 | Ensayo definitivo de *F. candida*: finalizar el ensayo, extraer los animales, medir el pH del suelo y la pérdida de agua (peso). |

▼M6

*Apéndice 3*

**Orientaciones sobre la cría y la sincronización de *F. fimetaria* y *F. candida***

El tiempo y las duraciones que figuran en estas orientaciones deben comprobarse para cada cepa concreta de colémbolos con el fin de asegurarse de que estas duraciones permitan la cría de suficientes juveniles sincronizados. Básicamente, la incidencia de oviposición después de que los adultos sean trasladados a un sustrato fresco y después de que los huevos eclosionen determina el día más adecuado para recoger los huevos y los juveniles sincrónicos.

Se recomienda contar con un cultivo madre permanente compuesto, por ejemplo, por 50 recipientes o placas de Petri. El cultivo madre debe mantenerse en buen estado de alimentación, mediante el aporte de alimento y de agua y la eliminación de los restos de alimentos y cadáveres, cada semana. Una cantidad demasiado pequeña de colémbolos en el sustrato puede provocar inhibición por un crecimiento mayor de hongos. Si el cultivo madre se utiliza con demasiada frecuencia para la producción de huevos, el cultivo puede agotarse. El agotamiento se refleja en forma de adultos muertos y moho en el sustrato. Los huevos restantes de la producción de animales sincrónicos pueden utilizarse para rejuvenecer el cultivo.

En un cultivo sincrónico de *F. fimetaria*, los machos se distinguen de las hembras principalmente por el tamaño. Los machos son claramente más pequeños que las hembras, y la velocidad al caminar de los machos es superior a la de las hembras. La selección correcta del sexo requiere poca práctica y puede confirmarse mediante la inspección microscópica del área genital (13).

1. **Cría**

1.a. *Preparación del sustrato de cultivo*

El sustrato de cultivo es yeso (sulfato cálcico) con carbón activado. Esto proporciona un sustrato húmedo y la función del carbón es absorber los gases residuales y los excrementos (14) (15). Se pueden utilizar distintos tipos de carbón para facilitar las observaciones de los colémbolos. Por ejemplo, con *F. candida* y con *F. fimetaria* se usa carbón en polvo (produce un yeso de color negro o gris):

Componentes del sustrato:

— 20 ml de carbón activado

— 200 ml de agua destilada

— 200 ml de yeso

**o bien**

— 50 g de carbón activado pulverizado

— 260-300 ml de agua destilada

— 400 g de yeso

La mezcla de sustrato debe reposar antes de usarla.

1.b. *Cría*

Los colémbolos se mantienen en recipientes tales como placas de Petri (90 × 13 mm), con el fondo cubierto por una capa de sustrato de yeso/carbón de 0,5 cm. Se cultivan a 20 ± 1 °C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12-12

▼M6

horas (400-800 lux). Los recipientes se mantienen húmedos en todo momento, asegurándose de que la humedad relativa del aire en su interior sea del 100 %. Esto se puede garantizar con la presencia de agua libre en el yeso poroso, pero evitando que se genere una capa de agua sobre la superficie del yeso. La pérdida de agua se puede evitar proporcionando aire ambiente húmedo. Los individuos muertos deben retirarse de los recipientes, así como todo alimento que tenga moho. Para estimular la producción de huevos, es necesario trasladar los animales adultos a placas de Petri con un nuevo sustrato recién preparado con yeso/carbón.

1.c. *Fuente de alimentos*

Se utiliza levadura seca granulada de panadería como único suministro de alimentos, tanto para *F. candida* como para *F fimetaria*. Una vez o dos veces a la semana se suministran alimentos frescos para evitar que se genere moho. Los alimentos se colocan directamente sobre el yeso, formando un pequeño montón. La masa de levadura de panadería añadida debe ajustarse al tamaño de la población de colémbolos pero, como norma general, son suficientes entre 2 y 15 mg.

2. **Sincronización**

El ensayo debe llevarse a cabo con animales sincronizados para obtener unos animales de ensayo homogéneos, de estadio y tamaño idénticos. Por otra parte, la sincronización permite la discriminación entre machos y hembras de *F. fimetaria* a partir de las tres semanas de edad, sobre la base del dimorfismo sexual, es decir, las diferencias de tamaño. El procedimiento que se indica a continuación es una sugerencia sobre la obtención de animales sincronizados (los pasos prácticos son opcionales).

2.a. *Sincronización.*

— Prepare los recipientes con una capa de sustrato de yeso/carbón de 0,5 cm.

— Para la puesta de huevos, transfiera a los recipientes entre 150 y 200 adultos de *F. fimetaria* y entre 50 y 100 de *F. candida* de los 15 o 20 mejores recipientes del cultivo madre con un sustrato de 4 a 8 semanas, y aliméntelos con 15 mg de levadura de panadería. Evite tomar juveniles junto con los adultos, ya que la presencia de juveniles puede inhibir la producción de huevos.

— Mantenga el cultivo a 20 ± 1 °C (la media debe ser de 20 °C) y un ciclo de luz-oscuridad de 12-12 horas (400-800 lux). Asegúrese de que haya alimento fresco disponible y que el aire esté saturado con agua. La falta de alimentos puede provocar que los animales defequen sobre los huevos, lo que provocaría el crecimiento de hongos en los huevos, o que *F. candida* canibalice sus propios huevos. Transcurridos diez días, los huevos se recogen con cuidado, con una aguja y una espátula, y se trasladan a un «papel para huevos» (trocitos de papel de filtro sumergidos en una lechada de yeso/carbón), que se coloca en un recipiente con un sustrato fresco de yeso/carbón. Se añaden unos granos de levadura al sustrato para atraer a los juveniles y provocar que salgan del papel para huevos. Es importante que el papel para huevos y el sustrato estén húmedos; de lo contrario, los huevos se deshidratarán. Como alternativa, los animales adultos pueden retirarse de las cajas de cultivo de sincronización después de que hayan producido huevos durante dos o tres días.

— Cuando han transcurrido tres días, la mayor parte de los huevos que se encuentran en el papel para huevos habrán eclosionado, y se podrán encontrar algunos juveniles debajo del papel para huevos.

— Para que los juveniles sean de una edad uniforme, el papel para huevos con huevos no eclosionados se retira de la placa de Petri con unas pinzas. Los juveniles, que ahora tienen entre 0 y 3 días, permanecen en la placa y se alimentan con levadura de panadería. Los huevos sin eclosionar se descartan.

— Los huevos y los juveniles que han eclosionado se cultivan de la misma forma que los adultos. En particular en lo que respecta a *F. fimetaria* se deben tomar las siguientes medidas: tras garantizar que hay suficiente alimento fresco, se retira el alimento viejo enmohecido y, después de una semana, los juveniles se distribuyen en nuevas placas de Petri, siempre que la densidad sea superior a 200.

▼**M6**

2.b. *Manipulación de los colémbolos al principio del ensayo*

— Se recogen ejemplares de *F. candida* de 9 a 12 días o de *F. fimetaria* de 23 a 26 días, por ejemplo mediante succión, y se sueltan en un pequeño recipiente con sustrato húmedo de yeso/carbón; su estado físico se comprueba con el microscopio binocular (se eliminan los animales lesionados y dañados). Todos los pasos deben llevarse a cabo mientras los colémbolos se mantienen en una atmósfera húmeda para evitar el estrés por desecación, por ejemplo mediante superficies húmedas, etc.

— Se pone boca abajo el recipiente y se le dan golpecitos para trasladar los colémbolos al suelo. La electricidad estática debe neutralizarse; de lo contrario, los animales podrían volar por el aire o adherirse al lateral del recipiente de ensayo y desecarse. Se puede utilizar un ionizador o un trapo húmedo debajo del recipiente para lograr la neutralización.

— El alimento debe repartirse por toda la superficie del suelo, no solo en un montón.

— Durante el transporte y durante el periodo del ensayo, se deben evitar los golpes u otros trastornos físicos en los recipientes de ensayo, ya que esto podría aumentar la compactación del suelo y dificultar la interacción entre los colémbolos.

3. **Especies alternativas de colémbolos**

Se pueden seleccionar otras especies de colémbolos para realizar el ensayo, de acuerdo con este método de ensayo, como las especies *Proisotoma minuta, Isotoma viridis, Isotoma anglicana, Orchesella cincta, Sinella curviseta, Paronychiurus kimi, Orthonychiurus folsomi* o *Mesaphorura macrochaeta.* Antes de usar estas otras especies deben cumplirse una serie de requisitos previos:

— se deben identificar de manera inequívoca;

— debe indicarse la justificación de la selección de la especie;

— se debe garantizar que la biología de la reproducción se incluya en la fase del ensayo, de forma que constituya un objetivo potencial durante la exposición;

— debe conocerse el ciclo vital: edad a la maduración, duración del desarrollo de los huevos y estadios sujetos a exposición;

— el sustrato del ensayo y el suministro de alimento deben proporcionar las condiciones óptimas de crecimiento y reproducción;

— la variabilidad debe ser lo suficientemente baja como para permitir una estimación precisa y correcta de la toxicidad.

▼M6

*Apéndice 4*

**Extracción y recuento de los animales**

1. **Se pueden usar dos métodos de extracción.**

1.a. Primer método: Se puede usar un extractor de gradiente de temperatura controlada con arreglo a los principios de MacFadyen (1). El calor procede de un elemento calefactor situado en la parte superior de la caja de extracción (que se regula mediante una resistencia térmica colocada en la superficie de la muestra de suelo). La temperatura del líquido enfriado que rodea al recipiente de recogida se regula mediante una resistencia térmica situada en la superficie de la caja de recogida (colocada debajo del núcleo de suelo). Las resistencias térmicas se conectan a una unidad de control programable que aumenta la temperatura de acuerdo con una planificación previa. Los animales se recogen en la caja de recogida enfriada (2 ·C) con una capa de yeso/carbón en el fondo. La extracción comienza a 25 °C y la temperatura aumenta automáticamente cada 12 horas en 5 °C, y dura en total 48 horas. La extracción finaliza tras doce horas a 40 °C.

1.b. Segundo método: Tras el periodo de incubación experimental, se evalúa por flotación el número de colémbolos juveniles presentes. Para ello, se realiza la prueba en los recipientes de un volumen aproximado de 250 ml. Al final de la prueba se añaden aproximadamente 200 ml de agua destilada. El suelo se agita suavemente con un pincel fino para que los colémbolos puedan flotar hasta la superficie del agua. Se puede añadir al agua una pequeña cantidad de tinta fotográfica negra de Kentmere, aproximadamente 0,5 ml, para facilitar el recuento aumentando el contraste entre el agua y los colémbolos de color blanco. La tinta no es tóxica para los colémbolos.

2. **Recuento:**

Los recuentos numéricos pueden realizarse a la vista o con un microscopio óptico, colocando una rejilla sobre el recipiente de flotación o fotografiando la superficie de cada recipiente y, posteriormente, contando los colémbolos mediante imágenes ampliadas o la proyección de diapositivas. Los recuentos también pueden realizarse con técnicas de procesamiento de imágenes digitales (12). Deben validarse todas las técnicas.

▼**M6**

*Apéndice 5*

**Determinación de la WHC máxima del suelo**

Se ha considerado apropiado el siguiente método para determinar la máxima capacidad de retención de agua (WHC) del suelo. Este método se describe en el anexo C de ISO DIS 11268-2 [Calidad del suelo. Efectos de los contaminantes en lombrices (*Eisenia fetida*). Parte 2: Determinación de los efectos en la reproducción].

Se recoge una cantidad definida (por ejemplo, 5 g) del sustrato de suelo del ensayo con un dispositivo de muestreo apropiado (tornillo sin fin, etc.). Se cubre el fondo del tubo con un trozo húmedo de papel de filtro y, a continuación, se coloca en una gradilla en un baño de agua. El tubo debe sumergirse gradualmente hasta que el nivel de agua quede por encima del del suelo. Luego debe dejarse en el agua durante unas tres horas. Como no se puede retener toda el agua absorbida por los capilares del suelo, la muestra de suelo debe drenarse durante dos horas, colocando el tubo en un lecho de arena de cuarzo triturada muy finamente, colocado dentro de un recipiente tapado (para evitar que se seque). Después hay que pesar la muestra y secarla hasta masa constante a 105 °C. La capacidad de retención de agua (WHC) debe calcularse de la siguiente manera:

$$\text{WHC (en \% de masa seca)} = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

Donde:

S = sustrato saturado de agua + masa del tubo + masa del papel de filtro

T = tara (masa del tubo + masa del papel de filtro)

D = masa seca del sustrato

▼M6

*Apéndice 6*

**Determinación del pH del suelo**

El siguiente método para calcular el pH de un suelo se basa en la descripción hecha en ISO DIS 10390: Calidad del suelo. Determinación del pH.

Una cantidad determinada de suelo se seca a temperatura ambiente durante 12 horas como mínimo. A continuación se elabora una suspensión del suelo (que contenga como mínimo 5 g de suelo), en cinco veces su volumen de una solución 1 M de cloruro potásico de grado analítico (KCl) o de una solución de 0,01 M de cloruro cálcico de grado analítico ($CaCl_2$). Después, la suspensión se agita bien, durante cinco minutos, y se deja reposar durante dos horas como mínimo, pero nunca más de 24 horas. A continuación, se mide el pH de la fase líquida con un pH-metro calibrado antes de cada medición con una serie adecuada de soluciones tampón (por ejemplo, pH de 4,0 y 7,0).

▼M6

## C.40. ENSAYO DE TOXICIDAD A LO LARGO DEL CICLO DE VIDA DE LOS QUIRONÓMIDOS EN SISTEMAS SEDIMENTO-AGUA CON AGUA O SEDIMENTO ENRIQUECIDOS

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 233 de la OCDE (2010). Se ha diseñado para evaluar en el díptero de agua dulce *Chironomus* sp. los efectos de la exposición durante toda la vida a sustancias y abarca completamente la primera generación (generación P) y la primera parte de la segunda generación (generación F1). Se trata de una ampliación de los métodos de ensayo existentes C.28 (1) o C.27 (15), que aplican un escenario de exposición con agua enriquecida o con sedimento enriquecido, respectivamente. Tiene en cuenta los protocolos existentes sobre ensayos de toxicidad para *Chironomus riparius* y *Chironomus dilutus* [anteriormente denominado *C. tentans* (2)] que se han elaborado en Europa y América del Norte (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9), y posteriormente sometido a ensayos interlaboratorios (1) (7) (10) (11) (12). Pueden utilizarse asimismo otras especies de quironómidos bien documentadas como, por ejemplo, *Chironomus yoshimatsui* (13) (14). La duración de la exposición completa es de aproximadamente cuarenta y cuatro días para *C. riparius* y *C. yoshimatsui*, y de aproximadamente cien días para *C. dilutus*.

2. En este método de ensayo se describe tanto el escenario de exposición en agua como el escenario de exposición en sedimento. La selección del escenario de exposición adecuado depende de la aplicación que se prevea para el ensayo. El escenario de exposición en agua, con enriquecimiento de la columna de agua, pretende simular un caso de aerosol errático de un plaguicida y comprende el pico inicial de concentración en aguas superficiales. El enriquecimiento del agua también es útil para otros tipos de exposición (incluyendo los derrames de sustancias), pero no para procesos de acumulación en el sedimento que duren más que el periodo del ensayo. En ese caso y cuando las escorrentías son la principal vía de entrada de los plaguicidas en las masas de agua, un diseño de sedimento enriquecido podría resultar más adecuado. Si otros escenarios de exposición resultaran interesantes, el diseño del ensayo podría adaptarse fácilmente. Por ejemplo, si la distribución de la sustancia problema entre la fase acuosa y la capa de sedimento no resulta interesante y hay que minimizar la adsorción en el sedimento, se puede contemplar la posibilidad de usar un sedimento artificial sustituto (por ejemplo, arena de cuarzo).

3. Las sustancias que deben someterse a ensayo con respecto a organismos que viven en los sedimentos pueden persistir en un sedimento durante largos periodos. Los organismos que viven en los sedimentos pueden estar expuestos a través de varias vías de exposición. La importancia relativa de cada vía de exposición y el tiempo que tarda cada una de ellas en contribuir al efecto tóxico general dependen de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia correspondiente. En el caso de las sustancias que se adsorben fuertemente o en el de las sustancias que se unen covalentemente con el sedimento, la ingestión de alimentos contaminados puede constituir una vía de exposición significativa. A fin de no subestimar la toxicidad de las sustancias muy lipofílicas, puede considerarse la adición de alimentos al sedimento antes de aplicar la sustancia problema (véase el punto 31). Por lo tanto, se pueden incluir todas las vías de exposición y todas las fases de la vida.

4. Los parámetros medidos son el número total de adultos que aparecen (tanto en la primera como en la segunda generación), la tasa de desarrollo (tanto en la primera como en la segunda generación), la proporción de sexos de los adultos vivos y que aparecen totalmente (tanto en la primera como en la segunda generación), el número de cordones de huevos por hembra (solo en la primera generación) y la fertilidad de los cordones de huevos (solo en la primera generación).

5. Se recomiendan encarecidamente los sedimentos artificiales, que presentan diversas ventajas sobre los sedimentos naturales:

▼M6

— se reduce la variabilidad experimental porque se constituye una «matriz normalizada» reproducible y desaparece la necesidad de conseguir sedimentos limpios y no contaminados;

— pueden iniciarse los ensayos en cualquier momento sin problemas de variabilidad estacional del sedimento en cuestión, y no es necesario aplicar ningún tratamiento previo al sedimento para eliminar la fauna endógena;

— se reduce el coste en comparación con la recogida sobre el terreno de cantidades suficientes y necesarias para las pruebas sistemáticas;

— los sedimentos artificiales permiten realizar comparaciones de toxicidad entre distintos estudios y clasificaciones de las sustancias, de manera consecuente (3).

6. En el apéndice 1 se dan las definiciones utilizadas.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se exponen quironómidos de primer estadio larvario a un intervalo de concentraciones de la sustancia problema en un sistema de sedimento-agua. El ensayo comienza colocando las larvas de primer estadio (primera generación) en vasos de ensayo que contienen sedimento enriquecido o, alternativamente, el agua se enriquece con la sustancia problema después de añadir las larvas. Se evalúan la aparición de los quironómidos, el tiempo hasta su aparición y la proporción de sexos de los dípteros vivos que aparecen completamente. Los adultos aparecidos se trasladan a jaulas de cría para facilitar la enjambración, el apareamiento y la oviposición. Se evalúan el número de cordones de huevos producidos y su fertilidad. De estos cordones de huevos se obtienen las larvas de primer estadio de la segunda generación. Estas larvas se colocan en vasos de ensayo recién preparados (con un procedimiento de enriquecimiento igual al de la primera generación) para determinar la viabilidad de la segunda generación mediante una evaluación de su aparición, del tiempo transcurrido hasta la aparición y de la proporción de sexos de los dípteros vivos que aparecen totalmente (en el apéndice 5 figura un esquema del ensayo del ciclo de vida). Todos los datos se analizan mediante un modelo de regresión, para estimar la concentración que provocaría una reducción del x % en el parámetro relevante, o mediante pruebas de hipótesis para determinar una concentración sin efecto observado (NOEC). Esto último requiere una comparación mediante pruebas estadísticas de las respuestas de los grupos de tratamiento con las respuestas del control correspondiente. Cabe señalar que, en el caso del agua enriquecida, cuando las sustancias se degradan rápidamente, las fases posteriores de la vida de cada generación (por ejemplo, la fase pupal) pueden verse expuestas a un nivel de concentración muy inferior en el agua sobrenadante que las larvas de primer estadio. Si esto fuera preocupante y se necesitara un nivel de exposición comparable para cada fase de la vida, se podrán plantear las siguientes modificaciones en el método de ensayo:

— series paralelas con enriquecimiento en diferentes fases de la vida; o

— enriquecimiento repetido (o renovación del agua sobrenadante) del sistema del ensayo durante las dos fases del ensayo (primera y segunda generación), de modo que los intervalos de enriquecimiento (renovación) se ajusten a las características del destino de la sustancia problema.

Estas modificaciones solo son viables en el escenario de agua enriquecida, pero no en el del sedimento enriquecido.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

8. Deben conocerse la hidrosolubilidad de la sustancia problema, su presión de vapor, su log $K_{ow}$, su reparto medido o calculado en el sedimento y su estabilidad en el agua y en el sedimento. Para cuantificar la sustancia problema presente en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, debe disponerse de un método analítico fiable, cuya exactitud y límite de detección sean conocidos y se indiquen. Entre la información útil se incluyen la fórmula estructural y la pureza de la sustancia problema. También resulta útil conocer el destino químico de la sustancia

▼M6

problema (por ejemplo, disipación, degradación abiótica y biótica, etc.). En la referencia (16) se ofrece más orientación sobre los ensayos de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan la realización del ensayo.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Las sustancias de referencia pueden someterse periódicamente a ensayos para asegurarse de que la sensibilidad de la población del laboratorio no ha variado. Al igual que sucede con las dafnias, sería suficiente realizar un ensayo agudo de 48 horas (de acuerdo con 17). Sin embargo, hasta que se disponga de unas directrices validadas de toxicidad aguda, puede plantearse un ensayo de toxicidad crónica conforme al capítulo C.28 de este anexo. Ejemplos de sustancias tóxicas de referencia usadas con buenos resultados en ensayos interlaboratorios y pruebas de validación son los siguientes: lindano, trifluralina, pentaclorofenol, cloruro de cadmio y cloruro de potasio (1) (3) (6) (7) (18).

VALIDEZ DEL ENSAYO

10. Para que el ensayo sea válido deben darse las condiciones siguientes:

— la aparición media en el grupo de control debe ser, como mínimo, del 70 % al final del periodo de exposición de ambas generaciones (1) (7);

— en lo que respecta a *C. riparius* y *C. yoshimatsui*, el 85 % del total de dípteros adultos aparecidos en el grupo de control, en ambas generaciones, debe producirse entre los 12 y los 23 días después de la inserción de las larvas de primer estadio en los recipientes; en lo que respecta a la especie *C. dilutus*, resulta aceptable un periodo de 20 a 65 días;

— la proporción media de sexos de adultos vivos que aparecen completamente (en forma de fracción de hembras o machos) en el grupo de control de ambas generaciones debe ser, como mínimo, de 0,4 y, como máximo, de 0,6;

— en cada jaula de cría, el número de cordones de huevos en los controles de la primera generación debe ser, como mínimo, de 0,6 por hembra añadida a la jaula de cría;

— la fracción de cordones de huevos fértiles de cada jaula de cría de los controles de la primera generación debe ser, como mínimo, de 0,6;

— al final del periodo de exposición de ambas generaciones, deben medirse el pH y la concentración de oxígeno disuelto de cada recipiente; la concentración de oxígeno debe ser, como mínimo, del 60 % del valor de saturación de aire (ASV ([1])) y el pH del agua sobrenadante debe ser de 6 a 9 en todos los recipientes de ensayo;

— la temperatura del agua no debe variar en más de ± 1,0 °C.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Recipientes de ensayo y jaulas de cría**

11. Las larvas se exponen en vasos de vidrio de 600 ml con un diámetro aproximado de 8,5 cm (véase el apéndice 5). Pueden utilizarse otros recipientes que garanticen una altura adecuada de sedimento y de agua sobrenadante. La superficie del sedimento debe ser suficiente para proporcionar de 2 a 3 $cm^2$ por larva. La proporción de la altura de la capa de

([1]) A 20 °C con una presión atmosférica normal, el ASV en agua dulce equivale a 9,1 mg/l (el 60 % equivale a 5,46 mg/l).

▼M6

sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser aproximadamente de 1:4. Deben utilizarse jaulas de cría (como mínimo de 30 cm en las tres dimensiones) con una gasa (luz de malla aproximada de 1 mm) en la parte superior y en un lateral de la jaula, como mínimo (véase el apéndice 5). En cada jaula se coloca un cristalizador de 2 l, que contiene agua y sedimento del ensayo, para la oviposición. También en el cristalizador, la proporción de la altura de la capa de sedimento respecto a la altura del agua sobrenadante debe ser de 1:4. Después de recoger los cordones de huevos del cristalizador, se colocan en una placa de microtitulación de 12 pocillos (un cordón por pocillo que contenga como mínimo 2,5 ml de agua procedente del cristalizador enriquecido), tras lo cual las placas se cubren con una tapa para evitar una evaporación importante. También pueden utilizarse otros recipientes adecuados para conservar los cordones de huevos. Con la excepción de las placas de microtitulación, todos los recipientes de ensayo y otros aparatos que entren en contacto con el sistema del ensayo deben estar hechos totalmente de vidrio o de otro material químicamente inerte (por ejemplo, politetrafluoroetileno).

**Selección de la especie**

12. La especie que debe usarse preferentemente en el ensayo es *Chironomus riparius*. También puede utilizarse la especie *C. yoshimatsui*. La especie *C. dilutus* también es adecuada, pero resulta más difícil de manipular y requiere un periodo de ensayo más largo. En el apéndice 2 se presenta información detallada sobre los métodos de cultivo de *C. riparius*. También hay información disponible sobre las condiciones de cultivo de *C. dilutus* (5) y *C. yoshimatsui* (14). Hay que confirmar la identificación de la especie antes de realizar los ensayos, pero no es necesario hacerlo antes de cada ensayo si los organismos proceden de un cultivo del propio laboratorio.

**Sedimento**

13. Es preferible utilizar un sedimento artificial (también denominado formulado, reconstituido o sintético). Sin embargo, si se utiliza sedimento natural, deben determinarse sus características (al menos, el pH y el contenido de carbono orgánico, pero es recomendable determinar otros parámetros, como la relación C/N y la granulometría) y debe estar libre de toda contaminación y de otros organismos que pudieran competir con las larvas de quironómidos o consumirlas. Asimismo, antes del ensayo, se recomienda acondicionar los sedimentos durante siete días a las condiciones del ensayo. Se recomienda el siguiente sedimento artificial (1) (20) (21), tal y como se describe en (1):

a. 4-5 % de turba (peso seco): con un pH lo más cercano posible al intervalo 5,5 y 6,0; es importante usar turba en forma de polvo, finamente molida (tamaño de partículas ≤ 1 mm) y secada solo al aire;

b. 20 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

c. 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco); debe predominar la arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm);

d. Agua desionizada añadida para obtener un contenido de humedad en la mezcla final en el rango del 30–50 %;

e. Carbonato de calcio de calidad químicamente pura ($CaCO_3$) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento a 7,0 ± 0,5;

f. El contenido de carbono orgánico de la mezcla final debe ser del 2 % (± 0,5 %), ajustado mediante el empleo de las cantidades adecuadas de turba y arena, según las letras a) y c).

14. Debe conocerse el origen de la turba, del caolín y de la arena. Hay que comprobar que los componentes del sedimento no presentan contaminación química (por ejemplo, con metales pesados, compuestos organoclorados o compuestos organofosforados). En el apéndice 3 se describe un

▼M6

ejemplo de preparación del sedimento artificial. Puede aceptarse también la mezcla de componentes secos si se demuestra que, tras la adición de agua sobrenadante, no se produce separación de los componentes del sedimento (por ejemplo, flotación de partículas de turba), y que la turba o el sedimento están suficientemente acondicionados.

**Agua**

15. Es adecuada como agua para el ensayo cualquier agua que se ajuste a las características químicas de un agua de dilución aceptable según se indica en los apéndices 2 y 4. Puede utilizarse como agua de cultivo y agua de ensayo cualquier agua adecuada, agua natural (superficial o subterránea), agua reconstituida (véase el apéndice 2) o agua del grifo desclorada, siempre que los quironómidos sobrevivan en ella durante las fases de cultivo y ensayo sin mostrar signos de presión. Al inicio del ensayo, el pH del agua de ensayo debe estar entre 6 y 9 y la dureza total no debe superar el valor de 400 mg/l en $CaCO_3$. Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt). Debe usarse el mismo tipo de agua a lo largo de todo el estudio. Las características de calidad del agua recogidas en el apéndice 4 deben medirse al menos dos veces al año o cuando se sospeche que pueden haber cambiado de forma significativa.

**Soluciones madre — agua enriquecida**

16.a. Las concentraciones de ensayo se calculan a partir de las concentraciones en la columna de agua, es decir, en el agua sobrenadante, que recubre al sedimento. Las soluciones de ensayo de las concentraciones elegidas se preparan generalmente por dilución de una solución madre. A ser posible, estas soluciones madre deben prepararse disolviendo la sustancia problema en el agua del ensayo. En algunos casos puede ser necesario utilizar disolventes o dispersantes para obtener una solución madre a la concentración deseada. Como ejemplos de disolventes adecuados pueden darse los siguientes: acetona, éter monoetílico de etilenglicol, éter dimetílico de etilenglicol, dimetilformamida y trietilenglicol. Los dispersantes que pueden utilizarse son Cremophor RH40, Tween 80, metilcelulosa al 0,01 % y HCO-40. La concentración del agente solubilizante en el medio de ensayo final debe ser mínima (es decir, $\leq$ 0,1 ml/l) y la misma en todos los tratamientos. Cuando se emplea un agente solubilizante, ello no debería provocar efectos significativos en la supervivencia, tal y como se revela mediante un control de disolvente en comparación con un control negativo (agua). No obstante, debe hacerse todo lo posible por evitar el uso de dichas sustancias.

**Soluciones madre — sedimento enriquecido**

16.b. Los sedimentos enriquecidos de la concentración elegida se preparan por lo general añadiendo una solución de la sustancia problema directamente al sedimento. La solución madre de la sustancia problema preparada con agua desionizada se mezcla con el sedimento artificial mediante un molino de rodillos, una mezcladora de piensos o a mano. Si la sustancia problema es poco hidrosoluble, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo). Esta solución se mezcla a continuación con 10 g de arena de cuarzo fina por cada recipiente de ensayo. Se permite que el disolvente se evapore; debe eliminarse totalmente de la arena y, a continuación, la arena se mezcla con la cantidad de sedimento adecuada. Para solubilizar, dispersar o emulsionar la sustancia problema solo pueden utilizarse agentes que se volatilicen rápidamente. No hay que olvidar que la arena aportada por la mezcla de sustancia problema y arena debe tenerse en cuenta a la hora de preparar el sedimento (es decir, en ese caso, el sedimento debe prepararse con menos arena). Debe tenerse

▼M6

cuidado para asegurarse de que la sustancia problema añadida al sedimento se distribuya de forma total y homogénea por el sedimento. En caso necesario, deben analizarse submuestras para determinar el grado de homogeneidad.

DISEÑO DEL ENSAYO

17. El diseño del ensayo se refiere a la selección del número y de la separación de las concentraciones de ensayo, el número de recipientes de cada concentración, el número de larvas por recipiente y el número de cristalizadores y jaulas de cría. A continuación se describen los diseños para obtener la $EC_x$, y la NOEC y el de una prueba de límite.

**Diseño para análisis de regresión**

18. La concentración con efecto ($EC_x$) y el intervalo de concentración en el que el efecto de la sustancia problema resulta de interés deben quedar abarcados por el ensayo, de forma que el parámetro no quede extrapolado fuera de los límites de los datos generados. Debe evitarse una extrapolación muy inferior a la concentración más baja o muy superior a la más alta. Puede resultar útil llevar a cabo una prueba preliminar de determinación del intervalo de concentraciones de acuerdo con los métodos de ensayo C.27 o C.28 para seleccionar un intervalo adecuado de concentraciones del ensayo.

19. En lo que respecta a un planteamiento de $EC_x$, se requieren como mínimo cinco concentraciones y ocho réplicas por concentración. Para cada concentración deben utilizarse dos jaulas de cría (A y B). Las ocho réplicas se dividen en dos grupos de cuatro réplicas, un grupo para cada jaula de cría. Esta agrupación de réplicas es necesaria debido al número de dípteros que se necesitan en la jaula para realizar evaluaciones de reproducción sólidas. Sin embargo, la segunda generación tiene de nuevo ocho réplicas, que se inician desde las poblaciones expuestas en las jaulas de cría. El factor entre concentraciones no debe ser mayor que dos (puede permitirse una excepción en los casos en que la pendiente de la curva dosis-respuesta sea poco pronunciada). El número de réplicas de cada tratamiento se puede reducir a seis (tres por cada jaula de cría) si aumenta el número de concentraciones de ensayo con respuestas distintas. El aumento del número de réplicas o la reducción del tamaño de los intervalos de concentraciones de ensayo tienden a estrechar los intervalos de confianza en relación con la $EC_X$.

**Diseño para estimar una NOEC**

20. En lo que respecta a un planteamiento de NOEC, se deben usar cinco concentraciones de ensayo con un mínimo de ocho réplicas (cuatro para cada jaula de cría, A y B), y el factor entre concentraciones no debe ser superior a dos. El número de réplicas debe ser suficiente para garantizar una potencia estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % con respecto al control y al nivel de significación del 5 % ($\alpha$ = 0,05). En lo que respecta a la tasa de desarrollo, la fecundidad y la fertilidad, suele ser apropiado realizar un análisis de varianza (ANOVA), seguido por la prueba de Dunnett o la prueba de Williams (22-25). En lo que respecta a la tasa de aparición y a la proporción de sexos, pueden resultar apropiadas la prueba de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (con la corrección de Bonferroni) o la prueba de Mantel-Haentzal.

**Ensayo límite**

21. Se puede llevar a cabo un ensayo límite (una sola concentración de ensayo y control o controles) si no se observan efectos en la prueba preliminar opcional de determinación del intervalo de concentraciones hasta con una concentración máxima. El objetivo del ensayo límite es indicar si se han encontrado efectos tóxicos de la sustancia problema en unos niveles superiores a la concentración límite analizada. Para el agua se sugieren 100 mg/l y, para el sedimento, 1 000 mg/kg (peso seco). Generalmente hacen falta al menos ocho réplicas tanto de las unidades de tratamiento como de las de control. Debe demostrarse una potencia

▼M6

estadística adecuada que permita detectar una diferencia del 20 % respecto al control con un nivel de significación del 5 % ($\alpha$ = 0,05). Con respuestas métricas (por ejemplo, tasa de desarrollo), la prueba t es un método estadístico adecuado si los datos cumplen los requisitos de esta prueba (normalidad, varianzas homogéneas). Si estos requisitos no se satisfacen, puede utilizarse una prueba t de varianzas desiguales o una prueba no paramétrica, como la prueba de Wilcoxon-Mann-Whitney. En relación con la tasa de aparición, resulta adecuada la prueba exacta de Fisher.

PROCEDIMIENTO

**Condiciones de exposición**

*Preparación del sistema agua-sedimento (enriquecimiento del agua)*

22. a. Se añade sedimento artificial (véanse los puntos 13 y 14 y el apéndice 3) a cada recipiente de ensayo y al cristalizador para formar una capa de al menos 1,5 cm (en el cristalizador puede ser algo menor) y de 3 cm como máximo. Se añade agua (véase el punto 15) de forma que la proporción de la altura de la capa de sedimento y la altura del agua no sea superior a 1:4. Tras preparar los recipientes de ensayo, el sistema de sedimento-agua debe airearse suavemente durante unos siete días, antes de añadir las larvas de primer estadio de la primera o la segunda generación (véanse el punto 14 y el apéndice 3). El sistema sedimento-agua de los cristalizadores no se airea durante el ensayo, ya que no tiene que asegurar la supervivencia de las larvas (los cordones de huevos ya se han recogido antes de que eclosionen). Para evitar que se separen los ingredientes del sedimento y se resuspendan las partículas finas durante la adición del agua de ensayo a la columna de agua, se puede cubrir el sedimento con un disco de plástico mientras se vierte el agua encima, y retirar el disco inmediatamente a continuación. Puede ser adecuado también utilizar otros dispositivos.

*Preparación del sistema agua-sedimento (enriquecimiento del sedimento)*

22. b. Se colocan en los recipientes y en el cristalizador sedimentos enriquecidos preparados de conformidad con el punto 16.b, y se añade agua sobrenadante para conseguir una proporción de volumen de sedimento-agua de 1:4. La altura de la capa de sedimento debe encontrarse entre 1,5 y 3 cm (puede ser algo inferior en el cristalizador). Para evitar que se separen los ingredientes del sedimento y se resuspendan las partículas finas durante la adición del agua de ensayo a la columna de agua, se puede cubrir el sedimento con un disco de plástico mientras se vierte el agua encima, y retirar el disco inmediatamente a continuación. Puede ser adecuado también utilizar otros dispositivos. Una vez preparado el sedimento enriquecido con el agua sobrenadante, es conveniente dejar que la sustancia problema se reparta pasando del sedimento a la fase acuosa (4) (5) (7) (18). Preferentemente, esto debe efectuarse en las mismas condiciones de temperatura y aireación que el ensayo. El tiempo adecuado para el equilibrado depende de la sustancia y del sedimento, y puede ser del orden de horas o de días, aunque en ciertos casos poco frecuentes puede llegar a ser de hasta cinco semanas. Como esto daría ocasión para la degradación de muchas sustancias, no se espera hasta alcanzar el equilibrio completo, sino que se recomienda un periodo de equilibrado de 48 horas. Sin embargo, cuando se sabe que la vida media de degradación de la sustancia en el sedimento es prolongada (véase el punto 8), puede ampliarse el tiempo de equilibrado. Al final de este periodo de equilibrado adicional, debe medirse la concentración de la sustancia problema en el agua sobrenadante, en el agua intersticial y en el sedimento, al menos con la concentración más elevada y con una inferior (véase el apartado 38). Estas determinaciones analíticas de la sustancia problema permiten el cálculo del balance de masas y la expresión de los resultados sobre la base de las concentraciones medidas.

23. Los recipientes de ensayo tienen que estar tapados (por ejemplo, con placas de vidrio). Cuando sea necesario durante el estudio, los niveles de agua pueden completarse hasta el volumen original para compensar la evaporación. En esta operación debe utilizarse agua destilada o desionizada para evitar la acumulación de sales. Los cristalizadores de las jaulas

▼M6

de cría no se tapan y pueden ajustarse, aunque no es necesario, para compensar la pérdida de agua durante el periodo del ensayo, ya que los cordones de huevos solo están en contacto con el agua durante un día aproximadamente, y los cristalizadores se utilizan solamente durante una breve fase del ensayo.

*Adición de los organismos de ensayo*

24. Cuatro o cinco días antes de la adición de las larvas de primer estadio de la primera generación, se deben tomar masas de huevos del cultivo para colocarlas en pequeños recipientes con medio de cultivo. Puede utilizarse un medio viejo del cultivo madre o un medio recién preparado. En cualquier caso, se debe añadir al medio de cultivo una pequeña cantidad de alimento; por ejemplo, unas gotas de filtrado de una suspensión muy bien triturada de alimento para peces en copos (véase el apéndice 2). Solo deben utilizarse masas de huevos recién puestas. Normalmente, las larvas empiezan a eclosionar un par de días después de la puesta de los huevos (entre dos y tres días en el caso de *C. riparius*, a 20 °C, y entre uno y cuatro días en lo que respecta a *C. dilutus*, a 23 °C, y *C. yoshimatsui*, a 25 °C); el crecimiento de las larvas se produce en cuatro estadios, cada uno de ellos de cuatro a ocho días de duración. En el ensayo deben utilizarse larvas del primer estadio (como máximo, 48 horas después de la eclosión). El estadio de las larvas puede comprobarse mediante el ancho de la cápsula de la cabeza (7).

25. Veinte larvas de primer estadio de la primera generación se asignan aleatoriamente a cada recipiente de ensayo que contenga el sistema de sedimento-agua, con una pipeta roma. La aireación del agua se interrumpe mientras se añaden las larvas a los recipientes de ensayo, situación que debe mantenerse durante 24 horas tras la adición de las larvas (véase el punto 32). Con arreglo al diseño del ensayo utilizado (véanse los puntos 19 y 20), el número de larvas utilizadas por concentración es como mínimo de 120 (seis réplicas por concentración) en el caso del planteamiento de $EC_x$, y de 160 en el caso del planteamiento de NOEC (ocho réplicas por concentración). En el diseño del sedimento enriquecido, la exposición comienza al añadir las larvas.

*Enriquecimiento del agua sobrenadante*

26. Veinticuatro horas después de añadir las larvas de primer estadio de la primera generación, la columna de agua sobrenadante se enriquece con la sustancia problema y se vuelve a iniciar una ligera aireación (las posibles modificaciones del diseño del ensayo se pueden consultar en el punto 7). Utilizando una pipeta, se aplican pequeños volúmenes de las soluciones madre de la sustancia problema por debajo de la superficie del agua. A continuación debe mezclarse el agua sobrenadante, con cuidado de no alterar el sedimento. En el caso del diseño de agua enriquecida, la exposición comienza con el enriquecimiento del agua (es decir, un día después de añadir las larvas).

*Recogida de los adultos aparecidos*

27. Los dípteros aparecidos de la primera generación se recogen una vez al día como mínimo, pero preferiblemente dos veces (véase el punto 36), de los recipientes de ensayo, con ayuda de un aspirador, un extractor o de un dispositivo similar (véase el apéndice 5). Se debe tener especial cuidado para no causar daños en los adultos. Los dípteros recogidos de los cuatro recipientes de ensayo de un mismo tratamiento se dejan en una jaula de cría a la que han sido asignados previamente. El día de la primera aparición (de los machos), los cristalizadores se enriquecen mediante pipeteo con un pequeño volumen de la solución madre de la sustancia problema por debajo de la superficie del agua (diseño de agua enriquecida). A continuación debe mezclarse el agua sobrenadante, con cuidado de no alterar el sedimento. La concentración de la sustancia problema en el cristalizador es nominalmente el mismo que la de los recipientes de ensayo asignados a esa jaula de cría en concreto. En lo que respecta al diseño de sedimento enriquecido, los cristalizadores se preparan en torno al día 11 a partir del inicio de la exposición (es decir, la adición de las

▼M6

larvas de primera generación), de forma que se puedan equilibrar durante unas 48 horas antes de que se produzcan los primeros cordones de huevos.

28. Los cordones de huevos se recogen del cristalizador que se encuentra en la jaula de cría con unas pinzas o una pipeta roma. Cada cordón de huevos se coloca en un recipiente que contiene medio de cultivo del cristalizador del cual se haya recogido (por ejemplo, un pocillo de una microplaca de 12 pocillos con un volumen mínimo de 2,5 ml de medio). Los recipientes que contienen los cordones de huevos se cubren con una tapa para evitar una evaporación significativa. Los cordones de huevos se conservan para su observación durante seis días como mínimo después de su producción, para clasificarlos como fértiles o infértiles.

Para comenzar con la segunda generación, se seleccionan al menos tres cordones de huevos fértiles, pero preferiblemente seis, de cada jaula de cría, y se permite que eclosionen junto con algo de alimento. Estos cordones de huevos deberían haberse producido en el pico de la oviposición, que normalmente se produce en torno al día 19 en los controles. Idealmente, la segunda generación de todos los tratamientos comienza el mismo día, pero es posible que esto no siempre sea así debido a los efectos de la sustancia en el desarrollo de las larvas. En ese caso, las concentraciones más altas pueden iniciarse después de los tratamientos más bajos y el control (de disolvente).

29. a. En el diseño de agua enriquecida, el sistema de sedimento-agua de la segunda generación se prepara enriqueciendo la columna de agua sobrenadante con la sustancia problema aproximadamente una hora antes de añadir las larvas de primer estadio a los recipientes de ensayo. Utilizando una pipeta, se aplican pequeños volúmenes de las soluciones de la sustancia problema por debajo de la superficie del agua. A continuación debe mezclarse el agua sobrenadante, con cuidado de no alterar el sedimento. Tras el enriquecimiento se suministra una ligera aireación.

29. b. En el diseño de sedimento enriquecido, los recipientes de exposición que contienen el sistema de sedimento-agua de la segunda generación se preparan de la misma manera que los de la primera generación.

30. Veinte larvas de primer estadio (como máximo, 48 horas después de la eclosión) de la segunda generación se asignan aleatoriamente a cada recipiente de ensayo que contenga el sistema enriquecido de sedimento-agua, con una pipeta roma. La aireación del agua se interrumpe mientras se añaden las larvas de primer estadio a los recipientes de ensayo, situación que debe mantenerse durante 24 horas más tras la adición de las larvas. Con arreglo al diseño del ensayo utilizado (véanse los puntos 19 y 20), el número de larvas utilizadas por concentración es como mínimo de 120 (seis réplicas por concentración) en el caso del planteamiento de $EC_X$, y de 160 en el caso del planteamiento de NOEC (ocho réplicas por concentración).

*Alimentos*

31. Es necesario alimentar a las larvas de los recipientes de ensayo, preferiblemente cada día o, como mínimo, tres veces a la semana. Una cantidad de 0,25 a 0,5 mg (de 0,35 a 0,5 mg para *C. yoshimatsui*) de alimento para peces (una suspensión en agua o en alimentos muy bien triturados; por ejemplo, Tetra-Min o Tetra-Phyll, véase la información del apéndice 2) por larva y por día es una cantidad adecuada de alimento para las larvas jóvenes durante los diez primeros días de su desarrollo. Las larvas de más edad pueden necesitar algo más de comida: entre 0,5 y 1,0 mg por larva al día debería ser suficiente durante el resto del ensayo. La ración alimentaria debe reducirse en todos los tratamientos y controlarse si se observa crecimiento de hongos o si se aprecia mortalidad en los controles. Si no puede detenerse el desarrollo fúngico, hay que repetir el ensayo.

La relevancia toxicológica de la exposición por ingestión es, en general, superior en las sustancias con una gran afinidad por el carbono orgánico o en las sustancias que se fijan covalentemente al sedimento. Por lo tanto,

▼M6

cuando se realicen pruebas con sustancias con estas propiedades, la cantidad de alimento necesario para garantizar la supervivencia y el crecimiento natural de las larvas puede añadirse al sedimento artificial antes del periodo de estabilización, en función del requisito reglamentario. Para evitar el deterioro de la calidad del agua, debe utilizarse material vegetal en lugar de alimento para peces; por ejemplo, la adición de un 0,5 % de hojas muy trituradas (peso seco) de ortiga (*Urtica dioica*), morera (*Morus alba*), trébol blanco (*Trifolium repens*), espinacas (*Spinacia oleracea*) u otro material vegetal (*Cerophyl* o α-celulosa). La adición de la ración completa de una fuente de alimento orgánico al sedimento antes del enriquecimiento no es algo trivial en lo que respecta a la calidad del agua y las características biológicas (21), ni tampoco constituye un método normalizado, pero hay estudios recientes que señalan que este método funciona (19) (26). Los dípteros adultos de la jaula de cría normalmente no necesitan alimento, pero la fecundidad y la fertilidad mejoran cuando se ofrece una almohadilla de algodón empapada en una solución de sacarosa saturada como fuente de alimento para los adultos aparecidos (34).

*Condiciones de incubación*

32. Se aporta aireación suave al agua sobrenadante de los recipientes de ensayo transcurridas 24 horas de la adición de las larvas de primer estadio de las dos generaciones, y se continúa a lo largo de todo el ensayo (debe tenerse cuidado para que la concentración de oxígeno disuelto no caiga por debajo del 60 % del ASV). La aireación se proporciona mediante una pipeta Pasteur de vidrio, cuya salida se encuentra a 2-3 cm por encima de la capa de sedimento y que genera unas cuantas burbujas por segundo. Cuando se realicen ensayos con sustancias volátiles, no hay que airear el sistema de sedimento-agua; no obstante, hay que satisfacer el criterio de validez de un mínimo del 60 % del ASV (punto 10). Se ofrece más orientación en (16).

33. El ensayo con *C. riparius* se lleva a cabo a una temperatura constante de 20 °C (± 2 °C). En el caso de *C. dilutus* y *C. yoshimatsui*, las temperaturas recomendadas son 23 °C y 25 °C (± 2 °C), respectivamente. Se usa un fotoperiodo de 16 horas, con una intensidad luminosa de 500 a 1 000 lux. En lo que respecta a las jaulas de cría, se puede incluir una hora más en la fase del amanecer y del atardecer.

*Duración de la exposición*

34. Diseño de agua enriquecida: El periodo de exposición de la primera generación comienza cuando el agua sobrenadante de los recipientes de ensayo se enriquece con la sustancia problema (esto sucede un día después de la inserción de las larvas; en el punto 7 se pueden consultar posibles modificaciones del diseño de la exposición). La exposición de la segunda generación de larvas comienza de inmediato, ya que se insertan en un sistema de sedimento-agua que ya se ha enriquecido. La duración máxima de la exposición de la primera generación es de 27 días y, la de la segunda generación, de 28 días (las larvas de la primera generación pasan un día en los recipientes sin exposición) en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui*. Teniendo en cuenta el solapamiento, la duración total del ensayo es de 44 días aproximadamente. En lo que respecta a *C. dilutus*, la duración máxima de la exposición es de 64 y 65 días para la primera y la segunda generación, respectivamente. La duración total es de cien días aproximadamente.

Diseño de sedimento enriquecido: la exposición comienza con la adición de las larvas y dura, como máximo, 28 días para las dos generaciones de *C. riparius* y *C. yoshimatsui*, y 65 días como máximo para las dos generaciones de *C. dilutus*.

**Observaciones**

*Aparición*

35. Para ambas generaciones, se determinan el tiempo de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras vivos que aparecen totalmente. Los machos se pueden identificar fácilmente gracias a sus antenas plumosas y la postura de su fino cuerpo.

▼M6

36. Los recipientes de ensayo de las dos generaciones deben observarse, como mínimo, tres veces por semana para realizar la evaluación visual de cualquier comportamiento anómalo de las larvas (por ejemplo, si se salen del sedimento, si nadan de forma poco habitual), en comparación con el control. Durante el periodo de aparición, que comienza unos 12 días después de la inserción de las larvas en el caso de *C. riparius* y *C. yoshimatsui* (20 días en el caso de *C. dilutus*), se cuentan los dípteros aparecidos y se clasifican por sexo al menos una vez, pero preferiblemente dos veces al día (temprano por la mañana y al final de la tarde). Tras la identificación, los dípteros de la primera generación se retiran con cuidado de los recipientes y se transfieren a una jaula de cría. Los dípteros de la segunda generación se retiran y se sacrifican después de la identificación. Los cordones de huevos depositados en los recipientes de ensayo de la primera generación deben recogerse individualmente y transferirse con un mínimo de 2,5 ml de agua original a microplacas de 12 pocillos (u otros recipientes adecuados), que se cubren con una tapa para evitar una evaporación significativa. Asimismo, hay que registrar el número de larvas muertas y de pupas visibles que no hayan conseguido dar lugar a adultos. En el apéndice 5 se presentan ejemplos de una jaula de cría, un recipiente de ensayo y un extractor.

*Reproducción*

37. Los efectos en la reproducción se evalúan mediante el número de cordones de huevos producidos por la primera generación de dípteros y la fertilidad de dichos cordones de huevos. Los cordones de huevos se recogen una vez al día del cristalizador que se ha colocado en cada recipiente de cría. Los cordones de huevos deben recogerse y transferirse con un mínimo de 2,5 ml de agua original a una microplaca de 12 pocillos (un cordón de huevos en cada pocillo) u otros recipientes adecuados, que se cubren con una tapa para evitar una evaporación significativa. Se documentan las siguientes características de cada cordón de huevos: día de producción, tamaño (normal, es decir, 1,0 ± 0,3 cm; o pequeño, típicamente ≤ 0,5 cm), estructura (normal = forma de plátano con una cadena de huevos en espiral; o anómala, por ejemplo, una cadena de huevos que no forman espiral) y fertilidad (fértiles o infértiles). A lo largo de los seis días posteriores a su producción, se evalúa la fertilidad de un cordón de huevos. Un cordón de huevos se considera fértil cuando eclosiona como mínimo una tercera parte de los huevos. El número total de hembras añadidas a la jaula de cría se utiliza para calcular el número de cordones de huevos por hembra y el número de cordones de huevos fértiles por hembra. En caso necesario, el número de huevos de un cordón se puede estimar de forma no destructiva con el método de recuento de anillas (que se detalla en las referencias 32 y 33).

**Mediciones analíticas**

*Concentración de la sustancia problema*

38. Como mínimo, deben analizarse muestras del agua sobrenadante, del agua intersticial y del sedimento al inicio de la exposición (en el caso del enriquecimiento del agua, preferiblemente una hora tras la aplicación) y al final del ensayo, a la concentración máxima y a una inferior. Esto se aplica a los recipientes de las dos generaciones. En los cristalizadores de la jaula de cría solo se analiza el agua sobrenadante, ya que este es el elemento con el que entran en contacto los cordones de huevos (en el diseño de sedimento enriquecido se puede plantear una confirmación analítica de la concentración en el sedimento). En caso necesario, se pueden realizar otras mediciones del sedimento, del agua intersticial o del agua sobrenadante durante el ensayo. Estas determinaciones de la concentración de la sustancia problema indican el comportamiento y el reparto de la sustancia problema en el sistema agua-sedimento. El muestreo de sedimento y agua intersticial al principio del ensayo y durante su realización (véase el punto 39) requiere más recipientes de ensayo para llevar a cabo determinaciones analíticas. Es posible que las mediciones del sedimento en el diseño de agua enriquecida no resulten necesarias si el reparto de la sustancia problema entre el agua y el sedimento ha quedado determinado claramente en un estudio de agua y sedimento en condiciones comparables (por ejemplo, relación sedimento-agua, tipo de aplicación, contenido de carbono orgánico en el sedimento), o si se demuestra

▼M6

que las concentraciones medidas en el agua sobrenadante se mantienen entre un 80 y un 120 % de las concentraciones iniciales nominales o medidas.

39. Cuando se hagan mediciones intermedias (por ejemplo, el día 7 o el día 14) y si los análisis necesitan grandes muestras que no puedan tomarse de los recipientes de ensayo sin afectar al sistema de ensayo, las determinaciones analíticas deben llevarse a cabo con muestras de recipientes de ensayo adicionales tratados de la misma manera (incluida la presencia de los organismos de ensayo), pero que no se utilizan para las observaciones biológicas.

40. El procedimiento recomendado para aislar el agua intersticial es la centrifugación, por ejemplo, a 10 000 g y a 4 °C durante 30 minutos. Sin embargo, si se demuestra que la sustancia problema no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial debido a que el volumen de la muestra es demasiado pequeño.

*Parámetros fisicoquímicos*

41. El pH, el oxígeno disuelto en el agua de ensayo y la temperatura del agua en los recipientes de ensayo y los cristalizadores deben medirse de forma adecuada (véase el punto 10). La dureza y el amoníaco deben medirse en los controles, así como en un recipiente de ensayo y en un cristalizador, a la concentración más alta, al principio y al final del ensayo.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

42. El objetivo de este ensayo de ciclo de vida es determinar el efecto de la sustancia problema en la reproducción y, a lo largo de dos generaciones, la tasa de desarrollo y el número total de dípteros machos y hembras vivos que aparecen totalmente. En lo que respecta a la tasa de aparición, deben agruparse los datos de los machos y las hembras. Si no hay diferencias estadísticamente significativas entre las sensibilidades en cuanto a la tasa de desarrollo de los distintos sexos, se pueden agrupar los resultados de los machos y las hembras para realizar un análisis estadístico.

43. Las concentraciones con efecto expresadas en forma de concentraciones en el agua sobrenadante (en el caso del agua enriquecida) o en el sedimento (en el caso del sedimento enriquecido) se calculan habitualmente sobre la base de las concentraciones medidas al principio de la exposición (véase el punto 38). Por lo tanto, en el caso del agua enriquecida, se calcula el promedio de cada tratamiento de las concentraciones medidas típicamente al principio de la exposición en el agua sobrenadante de los recipientes de ambas generaciones, así como las de los cristalizadores. En el caso del sedimento enriquecido, se calcula el promedio de cada tratamiento de las concentraciones medidas típicamente al principio de la exposición de ambas generaciones (y, opcionalmente, las de los cristalizadores).

44. Para calcular una estimación puntual, es decir, una $EC_x$, se pueden usar las estadísticas por recipiente y por jaula de cría como verdaderas réplicas. Al calcular un intervalo de confianza para cualquier $EC_x$, debe tenerse en cuenta la variabilidad entre recipientes, o bien hay que demostrar que esta variabilidad es tan pequeña que puede despreciarse. Cuando el modelo sigue el método de los mínimos cuadrados, debe aplicarse una transformación a las estadísticas por recipiente a fin de mejorar la homogeneidad de la varianza. Sin embargo, los valores de $EC_x$ deben calcularse después de haber vuelto a transformar la respuesta al valor original (31).

▼**M6**

45. Cuando la finalidad del análisis estadístico es determinar la NOEC mediante contrastes de hipótesis, hay que tener en cuenta la variabilidad entre recipientes, lo que se garantiza aplicando métodos ANOVA (por ejemplo, los procedimientos de las pruebas de Williams y de Dunnett). La prueba de Williams resultaría adecuada cuando se espera una relación dosis-respuesta monótona, en teoría, y la prueba de Dunnett sería adecuada cuando no se sostenga la hipótesis de monotonicidad. También puede ser adecuado realizar ensayos más sólidos (27) en situaciones en las que no se cumplen los supuestos habituales de ANOVA (31).

*Tasa de aparición*

46. Las tasas de aparición son datos cuantales y pueden ser analizados con la prueba de Cochran-Armitage aplicada de forma secuencial, cuando se prevé una relación dosis-respuesta monótona y estos datos son coherentes con dicha previsión. En caso contrario, puede utilizarse una prueba exacta de Fisher o la prueba de Mantel-Haentzal con los valores p ajustados según Bonferroni-Holm. Si hay pruebas de que la variabilidad entre réplicas en una misma concentración es mayor de lo que indicaría una distribución binomial (lo que se denomina generalmente varianza «extrabinomial»), hay que utilizar una prueba de Cochran-Armitage o una prueba exacta de Fisher que sean sólidas, tal y como se propone en (27).

Se calcula la suma de dípteros vivos (machos más hembras) aparecidos por recipiente, $n_e$, y se divide por el número de larvas introducidas, $n_a$:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

donde:

ER = tasa de aparición

$n_e$ = número de dípteros vivos aparecidos por recipiente

$n_a$ = número de larvas introducidas por recipiente (normalmente, 20)

Cuando $n_e$ es superior a $n_a$ (es decir, cuando de forma no intencional se ha introducido un número de larvas superior al número previsto) $n_a$ debe hacerse igual a $n_e$.

47. Otro planteamiento que resulta más adecuado para las muestras de gran tamaño, cuando existe una varianza extrabinomial, consiste en tratar la tasa de aparición como una respuesta continua y utilizar procedimientos coherentes con estos datos de la *ER*. Se define aquí como muestra de gran tamaño la que corresponde a la situación en que tanto el número de dípteros aparecidos como el número de no aparecidos es superior a cinco, por (recipiente de) réplica.

48. Para aplicar los métodos ANOVA, hay que transformar primero los valores de *ER* mediante la transformación arcoseno de la raíz cuadrada o la transformación de Tukey-Freeman para obtener una distribución normal aproximada y uniformizar las varianzas. Cuando se usan las frecuencias absolutas es posible aplicar la prueba de Cochran-Armitage, la prueba exacta de Fisher (Bonferroni) o la prueba de Mantel-Haentzal. La transformación arcoseno de la raíz cuadrada se aplica tomando la función inversa del seno ($sen^{-1}$) de la raíz cuadrada de *ER*.

49. En lo que respecta a las tasas de aparición, los valores de $EC_x$ se calculan mediante un análisis de regresión [por ejemplo, modelos probit, logit o Weibull (28)]. Si no sirve el análisis de regresión (por ejemplo, cuando hay menos de dos respuestas parciales), se utilizan otros métodos no paramétricos, tales como la media móvil o la interpolación simple.

*Tasa de desarrollo*

50. El tiempo medio de desarrollo representa el intervalo de tiempo medio que transcurre entre la introducción de las larvas (día 0 del ensayo) y la aparición de la cohorte experimental de dípteros (para calcular el tiempo real de desarrollo hay que tener en cuenta la edad de las larvas en el

▼M6

momento de introducirlas). La tasa de desarrollo (unidad: 1/día) es la inversa del tiempo de desarrollo y corresponde a la porción de desarrollo larvario que se produce en un día. Es preferible utilizar la tasa de desarrollo para evaluar estos estudios de toxicidad en los sedimentos, ya que su varianza es menor y es más homogénea y próxima a la distribución normal en comparación con el tiempo de desarrollo. Por tanto, pueden usarse procedimientos de ensayos paramétricos más potentes con la tasa de desarrollo que con el tiempo de desarrollo. Considerando la tasa de desarrollo como una respuesta continua, es posible estimar los valores de $EC_x$ mediante análisis de regresión [por ejemplo, (29) (30)]. La NOEC para la tasa promedio de desarrollo puede determinarse con métodos ANOVA, como la prueba de Williams o la prueba de Dunnett. Como los machos aparecen antes que las hembras, es decir, presentan una tasa de desarrollo más alta, tiene sentido calcular la tasa de desarrollo de cada sexo por separado, además de la correspondiente a los dípteros en total.

51. En lo que respecta a las pruebas estadísticas, se supone que el número de dípteros observados en el día de inspección x ha aparecido a la media del intervalo de tiempo entre el día x y el día x – l (l = longitud del intervalo de inspección, que es normalmente de 1 día). La tasa de desarrollo media por recipiente ($\overline{x}$) se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\overline{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i X_i}{n_e}$$

donde:

$\overline{x}$: tasa de desarrollo media por recipiente

i: índice del intervalo de inspección

m: número máximo de intervalos de inspección

$f_i$: número de dípteros aparecidos en el intervalo de inspección i

$n_e$: número total de dípteros aparecidos al final del experimento ($\Sigma f_i$)

$x_i$: tasa de desarrollo de los dípteros aparecidos en el intervalo i

$$x_i = 1/\text{día}_i - \frac{l_i}{2}$$

donde:

$\text{día}_i$: día de inspección (días desde la introducción de las larvas)

$l_i$: longitud del intervalo de inspección i (en días, generalmente 1 día)

*Proporción de sexos*

52. Las proporciones de sexos son datos cuánticos y, por lo tanto, deben evaluarse mediante una prueba exacta de Fisher u otros métodos adecuados. La proporción de sexos natural de *C. riparius* es uno, es decir, los machos y las hembras son igualmente abundantes. Para ambas generaciones, los datos relativos a la proporción de sexos deben tratarse de forma idéntica. Como el número máximo de dípteros por recipiente (es decir, 20) es demasiado bajo para un análisis estadístico significativo, el número

▼M6

total de dípteros totalmente aparecidos y vivos de cada sexo se suma en todos los recipientes de un mismo tratamiento. Estos datos no transformados se contrastan con los datos del control (disolvente) o los datos de control combinados en una tabla de contingencia 2 × 2.

*Reproducción*

53. La reproducción, al igual que la fecundidad, se calcula como el número de cordones de huevos por hembra. Más concretamente, el número total de cordones de huevos producidos en una jaula de cría se divide por el número total de hembras vivas en buen estado que se hayan añadido a esa jaula. Se puede calcular una NOEC para la fecundidad mediante métodos ANOVA, por ejemplo la prueba de Williams o la prueba de Dunnett.

54. La fertilidad de los cordones de huevos se utiliza para cuantificar el número de cordones de huevos fértiles por hembra. El número total de cordones de huevos fértiles producidos en una jaula de cría se divide por el número total de hembras vivas en buen estado que se hayan añadido a esa jaula. Se puede calcular una NOEC para la fertilidad con métodos ANOVA, por ejemplo, la prueba de Williams o la prueba de Dunnett.

**Informe del ensayo**

55. El informe del ensayo debe proporcionar la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas (hidrosolubilidad, presión de vapor, log $K_{ow}$, coeficiente de reparto en el suelo [o en el sedimento, si se conoce], estabilidad en el agua y en el sedimento, etc.); y

— datos de identificación química (nombre común, nombre químico, fórmula estructural, número CAS, etc.), incluida la pureza y el método de análisis cuantitativo de la sustancia problema.

*Especie de ensayo:*

— organismos utilizados en el ensayo: especie, nombre científico, origen de los organismos y condiciones de cría;

— información sobre la manipulación de las masas de huevos y las larvas;

— información sobre la manipulación de los adultos aparecidos de la primera generación con ayuda de un extractor, etc. (véase el apéndice 5); y

— edad de los organismos del ensayo en el momento de introducirlos en los recipientes de ensayo de primera y segunda generación.

*Condiciones de ensayo:*

— sedimento utilizado, es decir, si es natural o (artificial) formulado;

— sedimento natural: lugar y descripción de la zona de recogida del sedimento, incluyendo, si es posible, el historial de contaminación; características del sedimento: pH, contenido de carbono orgánico, relación C/N y granulometría (si procede);

— sedimento artificial: preparación, ingredientes y características (contenido de carbono orgánico, pH, humedad, etc., medidos al principio del ensayo);

— preparación del agua de ensayo (si se utiliza agua reconstituida) y características (concentración de oxígeno, pH, dureza, etc., al inicio del ensayo);

▼**M6**

— altura del sedimento y del agua sobrenadante de los recipientes de ensayo y los cristalizadores;

— volumen de agua sobrenadante y agua intersticial, peso del sedimento húmedo con y sin agua intersticial de los recipientes de ensayo y los cristalizadores;

— recipientes de ensayo (material y tamaño);

— cristalizadores (material y tamaño);

— jaulas de cría (material y tamaño);

— método de preparación de las soluciones madre y las concentraciones del ensayo para los recipientes de ensayo y los cristalizadores;

— aplicación de la sustancia problema en los recipientes de ensayo y en los cristalizadores: concentraciones de ensayo, número de réplicas y disolventes, en caso necesario;

— condiciones de incubación de los recipientes de ensayo: temperatura, ciclo de luz e intensidad, aireación (burbujas por segundo);

— condiciones de incubación de las jaulas de cría y los cristalizadores: temperatura, ciclo de luz e intensidad;

— condiciones de incubación de los cordones de huevos en las microplacas (u otros recipientes): temperatura, ciclo de luz e intensidad; e

— información detallada sobre la alimentación, incluidos el tipo de alimento, la preparación, la cantidad y el régimen alimentario.

*Resultados:*

— concentraciones de ensayo nominales, concentraciones de ensayo medidas y resultados de todos los análisis efectuados para determinar la concentración de la sustancia problema en los recipientes de ensayo y los cristalizadores;

— calidad del agua en los recipientes de ensayo y los cristalizadores, es decir, pH, temperatura, oxígeno disuelto, dureza y amoníaco;

— sustitución del agua de ensayo evaporada de los recipientes de ensayo, si procede;

— número de dípteros machos y hembras aparecidos por recipiente y por día de primera y segunda generación;

— proporción de sexos de los dípteros totalmente aparecidos y vivos, por tratamiento, de la primera y la segunda generación;

— número de larvas que no hayan conseguido aparecer como dípteros, por recipiente, de la primera y la segunda generación;

— porcentaje o fracción de aparición por réplica y concentración de ensayo (dípteros machos y hembras combinados) de primera y segunda generación;

— tasa media de desarrollo de los dípteros totalmente aparecidos y vivos por réplica y tasa de tratamiento (dípteros machos y hembras separados y en conjunto) de primera y segunda generación;

— número de cordones de huevos depositados en los cristalizadores por jaula de cría y día;

▼**M6**

— características de cada hilera de huevos (tamaño, forma y fertilidad);

— fecundidad: número total de cordones de huevos por número total de hembras añadidas a la jaula de cría;

— fertilidad: número total de cordones de huevos fértiles por número total de hembras añadidas a la jaula de cría;

— estimación de los parámetros de toxicidad como, por ejemplo, $EC_x$ (con intervalos de confianza asociados), NOEC y métodos estadísticos empleados para su determinación; y

— análisis de los resultados, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Capítulo C.28 del presente anexo. Ensayo sobre toxicidad para quironómidos en sistemas sedimento-agua con agua enriquecida.

(2) Shobanov, N.A., Kiknadze, I.I. and M.G. Butler (1999), Palearctic and Nearctic *Chironomus* (*Camptochironomus*) *tentans* Fabricius are different species (Diptera: Chironomidae). Entomologica Scandinavica, 30: pp. 311–322.

(3) Fleming, R. *et al.* (1994), Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances, Final Report to the European Commission, Report No: EC 3738. Agosto de 1994. WRc, Reino Unido.

(4) SETAC (1993), Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments, From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.

(5) ASTM International (2009), E1706-05E01: Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, en: Annual Book of ASTM Standards, Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(6) Environment Canada (1997), Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*), Biological Test Method, Report SPE 1/RM/32, diciembre de 1997.

(7) US-EPA (2000), Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, segunda edición, EPA 600/R-99/064, marzo 2000; revisión de la primera edición de junio de 1994.

(8) US-EPA/OPPTS 850.1735 (1996), Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

(9) US-EPA/OPPTS 850.1790 (1996), Chironomid Sediment toxicity Test.

(10) Milani, D., Day, K.E., McLeay, D.J. and R.S. Kirby (1996), Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*), Technical Report, Environment Canada, National Water Research Institute, Burlington, Ontario, Canadá.

(11) Norberg-King, T.J., Sibley, P.K., Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Ireland, S., Mount, D.R. and C.D. Rowland (2006), Interlaboratory evaluation of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* short-term and long-term sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 25: pp. 2662-2674.

▼**M6**

(12) Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V. and L. Weltje (2007), Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine-disrupting properties of pesticides, Ecotoxicology, 16: pp. 221-230.

(13) Sugaya, Y. (1997), Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui,* Jp. J. Sanit. Zool., 48: pp. 345-350.

(14) Kawai, K. (1986), Fundamental studies on chironomid allergy, I. Culture methods of some Japanese chironomids (Chironomidae, Diptera), Jp. J. Sanit. Zool., 37: pp. 47-57.

(15) Capítulo C.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad para quironómidos en sistemas sedimentos — agua con sedimento enriquecido.

(16) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment Nº 23, ENV/JM/MONO(2000)6, OCDE, París.

(17) Weltje, L., Rufli, H., Heimbach, F., Wheeler, J., Vervliet-Scheebaum, M. and M. Hamer (2010), The chironomid acute toxicity test: development of a new test system, Integr. Environ. Assess. Management.

(18) Environment Canada. (1995), Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant, Report EPS 1/RM/30, septiembre de 1995.

(19) Oetken, M, Nentwig, G., Löffler, D, Ternes, T. and J. Oehlmann (2005), Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates, Part I, The antiepileptic drug carbamazepine, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49: pp. 353-361.

(20) Suedel, B.C. and J.H. Rodgers (1994), Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, Environ. Toxicol. Chem., 13: pp. 1163-1175.

(21) Naylor, C. and C. Rodrigues (1995), Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, Chemosphere, 31: pp. 3291-3303.

(22) Dunnett, C.W. (1964), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: pp. 1096-1121.

(23) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, 20: pp. 482-491.

(24) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: pp. 103-117.

(25) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: pp. 510-531.

(26) Jungmann, D., Bandow, C., Gildemeister, T., Nagel, R., Preuss, T.G., Ratte, H.T., Shinn, C., Weltje, L. and H.M. Maes (2009), Chronic toxicity of fenoxycarb to the midge *Chironomus riparius* after exposure in sediments of different composition. J Soils Sediments, 9: pp. 94-102.

(27) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics, 48: pp. 577-585.

(28) Christensen, E.R. (1984), Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model, Water Res., 18: pp. 213-221.

▼**M6**

(29) Bruce, R.D. and D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environ. Toxicol. Chem., 11: pp. 1485-1494.

(30) Slob, W. (2002), Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66: pp. 298-312.

(31) OCDE (2006), *Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application*, OECD Series on Testing and Assessment Nº 54, 146 pp., ENV/JM/MONO(2006)18, OCDE, París.

(32) Benoit, D.A., Sibley, P.K., Juenemann, J.L. and G.T. Ankley (1997), *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments, Environ. Toxicol. Chem., 16: pp. 1165-1176.

(33) Vogt, C., Belz, D., Galluba, S., Nowak, C., Oetken, M. and J. Oehlmann (2007), Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera) — baseline experiments for future multi-generation studies, J. Environ. Sci. Health Part A, 42: pp. 1-9.

(34) OCDE (2010), Validation *report of the Chironomid full life-cycle toxicity test*, Forthcoming publication in the Series on Testing and Assessment, OCDE, París.

▼**M6**

*Apéndice 1*

**Definiciones**

A efectos del presente método de ensayo, aplicarán las siguientes definiciones:

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**Sedimento artificial** (o reconstituido, formulado o sintético): mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

**Agua sobrenadante**: agua situada sobre el sedimento en el recipiente de ensayo.

**Agua intersticial**: agua que ocupa el espacio entre las partículas del sedimento y del suelo.

**Agua enriquecida**: agua a la que se ha añadido la sustancia problema.

**Sustancia problema**: toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M6

*Apéndice 2*

**Recomendaciones para el cultivo de *Chironomus riparius***

1. Las larvas de *Chironomus* pueden criarse en cristalizadores o en recipientes más grandes. Sobre el fondo del recipiente se extiende arena de cuarzo fina, en una capa delgada de unos 5 a 10 mm de espesor. Se ha comprobado que la tierra de diatomeas (por ejemplo, Merck, Art 8117) también es un sustrato adecuado (es suficiente una capa más fina, de muy pocos milímetros). A continuación se añade agua adecuada hasta una altura de varios centímetros. Los niveles deben mantenerse rellenando con agua en la medida necesaria para compensar las pérdidas por evaporación y evitar la desecación. En caso necesario, es posible sustituir el agua. Debe aportarse una aireación suave. Los recipientes de cría de las larvas deben mantenerse en una jaula adecuada para evitar que se escapen los adultos que aparezcan. La jaula debe ser lo suficientemente grande como para permitir el enjambrado de los adultos aparecidos, ya que en caso contrario puede que no haya copulación (las dimensiones mínimas son de unos 30 × 30 × 30 cm).

2. Las jaulas deben mantenerse a temperatura ambiente o en una zona de temperatura ambiente constante a 20 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz (de intensidad alrededor de 1 000 lux) y 8 horas de oscuridad. Se ha comunicado que una humedad relativa del aire de menos del 60 % puede impedir la reproducción.

**Agua de dilución**

3. Puede emplearse cualquier agua natural o sintética que sea adecuada. Se suelen utilizar agua de pozo, agua del grifo desclorada y medios artificiales (como, por ejemplo, medio M4 o M7 de Elendt, véase más abajo). Es necesario airear el agua antes de utilizarla. En caso necesario, el agua de cultivo puede renovarse sacando cuidadosamente, por vertido o con sifón, el agua usada de los recipientes de cultivo sin destruir los tubos de las larvas.

**Alimentación de las larvas**

4. Las larvas de *Chironomus* deben alimentarse con comida para peces en copos (Tetra Min®, Tetra Phyll® u otra marca similar de comida comercial para peces), a un régimen de aproximadamente 250 mg por recipiente al día. Puede administrarse como polvo molido seco o como suspensión en agua: se añade 1,0 g de comida en copos a 20 ml de agua de dilución y se mezcla para obtener un resultado homogéneo. Este preparado se puede suministrar a un régimen de unos 5 ml por recipiente al día (se debe agitar antes de usar). Las larvas de más edad pueden recibir más alimento.

5. La alimentación se ajusta según la calidad del agua. Si el medio de cultivo se pone turbio, hay que reducir la alimentación. Se debe supervisar cuidadosamente la adición de comida. Si la comida es demasiado escasa, se provocará la emigración de las larvas hacia la columna de agua, mientras que si es excesiva aumentará la actividad microbiana y se reducirá la concentración de oxígeno. Ambas situaciones pueden producir un descenso de la tasa de crecimiento.

6. También se pueden añadir células de algas verdes (como, por ejemplo, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) cuando se preparan recipientes de cultivo nuevos.

**Alimentación de los adultos aparecidos**

7. Algunos investigadores han sugerido que un disco de algodón empapado en una solución saturada de sacarosa puede servir de alimento para los adultos emergidos.

▼M6

**Aparición**

8. A 20 ± 2 °C, los adultos empiezan a aparecer en los recipientes de cría de larvas, aproximadamente a los 13-15 días. Los machos se distinguen fácilmente porque tienen antenas plumosas y un cuerpo delgado.

**Masas de huevos**

9. Una vez haya adultos en la jaula de cría, deben supervisarse todos los recipientes de cría de larvas tres veces por semana para observar la puesta de masas gelatinosas de huevos. Cuando se encuentren, las masas de huevos deben retirarse con cuidado y transferirse a una pequeña placa que contenga una muestra del agua de cría. Las masas de huevos se emplean para preparar un nuevo recipiente de cultivo (por ejemplo, de 2 a 4 masas de huevos por recipiente) o para los ensayos de toxicidad.

10. Las larvas de primer estadio deben salir de los huevos al cabo de 2 o 3 días.

**Establecimiento de nuevos recipientes de cultivo**

11. Cuando se hayan establecido los cultivos, debe ser posible establecer un nuevo recipiente de cultivo de larvas cada semana o con menos frecuencia, según los requisitos del ensayo, eliminando los recipientes más viejos una vez han aparecido los dípteros adultos. Con este sistema, se obtendrá un suministro regular de adultos, con una gestión mínima.

**Preparación de las soluciones de ensayo «M4» y «M7»**

12. Elendt (1990) describió el medio «M4». El «M7» se prepara como el medio «M4», salvo en lo relativo a las sustancias indicadas en la tabla 1, cuyas concentraciones son cuatro veces más bajas en el medio «M7» que en el «M4». La solución de ensayo no debe prepararse de acuerdo con Elendt y Bias (1990), porque las concentraciones de $NaSiO_3 \times 5H_2O$, $NaNO_3$, $KH_2PO_4$ y $K_2HPO_4$ indicadas para la preparación de las soluciones madre no son adecuadas.

**Preparación del medio «M7»**

13. Las soluciones madre (I) se preparan por separado cada una y a partir de ellas se prepara una solución madre combinada (II) (véase la tabla 1). Se toman 50 ml de la solución madre combinada (II) junto con las cantidades de solución madre de cada macronutriente que figuran en la tabla 2, y se llevan a 1 litro con agua desionizada para preparar el medio «M7». Se prepara una solución madre de vitaminas añadiendo tres vitaminas al agua desionizada como se indica en la tabla 3, y se añade al medio «M7» final 0,1 ml de la solución madre de vitaminas combinadas, poco antes de su empleo. La solución madre de vitaminas se conserva congelada en pequeñas partes alícuotas. El medio se airea y se estabiliza.

*Tabla 1*

**Soluciones madre de oligoelementos para los medios M4 y M7**

| Soluciones madre (I) | Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada | Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada. | | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| $H_3BO_3$ ([1]) | 57 190 | 1,0 | 0,25 | 2,86 | 0,715 |
| $MnCl_2 \times 4H_2O$ ([1]) | 7 210 | 1,0 | 0,25 | 0,361 | 0,090 |
| LiCl ([1]) | 6 120 | 1,0 | 0,25 | 0,306 | 0,077 |

▼**M6**

| Soluciones madre (I) | Cantidad (mg) enrasada a 1 litro con agua desionizada | Para preparar la solución madre combinada (II): mezclar las siguientes cantidades (ml) de soluciones madre (I) y enrasar a 1 litro con agua desionizada. | | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo (mg/l) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | M4 | M7 | M4 | M7 |
| RbCl (1) | 1 420 | 1,0 | 0,25 | 0,071 | 0,018 |
| $SrCl_2 \times 6H_2O$ (1) | 3 040 | 1,0 | 0,25 | 0,152 | 0,038 |
| NaBr (1) | 320 | 1,0 | 0,25 | 0,016 | 0,004 |
| $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ (1) | 1 260 | 1,0 | 0,25 | 0,063 | 0,016 |
| $CuCl_2 \times 2H_2O$ (1) | 335 | 1,0 | 0,25 | 0,017 | 0,004 |
| $ZnCl_2$ | 260 | 1,0 | 1,0 | 0,013 | 0,013 |
| $CaCl_2 \times 6H_2O$ | 200 | 1,0 | 1,0 | 0,010 | 0,010 |
| KI | 65 | 1,0 | 1,0 | 0,0033 | 0,0033 |
| $Na_2SeO_3$ | 43,8 | 1,0 | 1,0 | 0,0022 | 0,0022 |
| $NH_4VO_3$ | 11,5 | 1,0 | 1,0 | 0,00058 | 0,00058 |
| $Na_2EDTA \times 2H_2O$ (1) (2) | 5 000 | 20,0 | 5,0 | 2,5 | 0,625 |
| $FeSO_4 \times 7H_2O$ (1) (2) | 1 991 | 20,0 | 5,0 | 1,0 | 0,249 |

(1) Estas sustancias difieren en M4 y M7, como se indica más arriba.
(2) Estas soluciones se preparan por separado y después se juntan y se pasan por el autoclave inmediatamente.

*Tabla 2*

**Soluciones madre de macronutrientes para los medios M4 y M7**

| | Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg) | Cantidad de soluciones madre de macronutrientes añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l) | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 293 800 | 1,0 | 293,8 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 246 600 | 0,5 | 123,3 |
| KCl | 58 000 | 0,1 | 5,8 |
| $NaHCO_3$ | 64 800 | 1,0 | 64,8 |
| $NaSiO_3 \cdot 9H_2O$ | 50 000 | 0,2 | 10,0 |
| $NaNO_3$ | 2 740 | 0,1 | 0,274 |
| $KH_2PO_4$ | 1 430 | 0,1 | 0,143 |
| $K_2HPO_4$ | 1 840 | 0,1 | 0,184 |

▼**M6**

*Tabla 3*

**Solución madre de vitaminas para los medios M4 y M7**

Las tres soluciones de vitaminas se combinan para formar una única solución madre de vitamins.a

| | Cantidad enrasada a 1 litro con agua desionizada (mg) | Cantidad de solución madre de vitaminas añadida para preparar los medios M4 y M7 (ml/l) | Concentraciones finales en las soluciones de ensayo de M4 y M7 (mg/l) |
|---|---|---|---|
| Clorhidrato de tiamina | 750 | 0,1 | 0,075 |
| Cianocobalamina (B12) | 10 | 0,1 | 0,0010 |
| Biotina | 7,5 | 0,1 | 0,00075 |

BIBLIOGRAFÍA

BBA (1995), Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system, edición de M. Streloke y H. Köpp. Berlín.

Elendt, B.P. (1990), Selenium deficiency in Crustacea, Protoplasma, 154: pp. 25-33.

Elendt, B.P. and W.-R. Bias (1990), Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing, Effects on the optimisation of culture conditions on life history parameters of *D. magna,* Water Research, 24: pp. 1157-1167.

▼M6

*Apéndice 3*

**Preparación del sedimento artificial**

COMPOSICIÓN DEL SEDIMENTO

La composición del sedimento artificial debe ser la siguiente:

| Componente | Características | % de sedimento (peso seco) |
|---|---|---|
| Turba | Turba esfágnea, de pH lo más próximo posible a 5,5-6,0, sin restos vegetales visibles, finamente triturada (tamaño de partícula ≤ 1 mm) y secada al aire | 4 - 5 |
| Arena de cuarzo | Granulometría: Más del 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50-200 μm | 75 - 76 |
| Caolín | Contenido en caolinita ≥ 30 % | 20 |
| Carbono orgánico | Ajustado mediante adición de turba y arena | 2 (± 0,5) |
| Carbonato de calcio | $CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro | 0,05 - 0,1 |
| Agua | Conductividad ≤ 10 μS/cm | 30 - 50 |

PREPARACIÓN

La turba se seca al aire y se tritura hasta convertirse en un polvo fino. Se prepara en agua desionizada una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba, utilizando un dispositivo de homogeneización de prestaciones elevadas. El pH de esta suspensión se ajusta a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. La suspensión se deja durante al menos dos días con agitación suave a 20 ± 2 °C, para estabilizar el pH e implantar un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH, que debe quedar a 6,0 ± 0,5. A continuación se mezcla la suspensión de turba con los demás componentes (arena y caolín) y con agua desionizada para obtener un sedimento homogéneo con un contenido de agua del 30–50 % del peso seco del sedimento. Se vuelve a medir el pH de la mezcla final y se ajusta a 6,5-7,5 con $CaCO_3$ en caso necesario. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido de carbono orgánico. Se recomienda a continuación que el sedimento artificial, antes de emplearse en el ensayo de toxicidad para quironómidos, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo.

ALMACENAMIENTO

Los componentes secos utilizados para preparar el sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente. El sedimento (húmedo) ya preparado no debe almacenarse antes de su empleo en el ensayo. Debe utilizarse inmediatamente tras el tiempo de acondicionamiento de 7 días con que termina su preparación.

BIBLIOGRAFÍA

OECD (1984), *Earthworm, Acute Toxicity Test*, Test Guideline N$^{o}$ 207, Guidelines for the Testing of Chemicals, OCDE, París.

Meller, M., Egeler, P., Roembke, J., Schallnass, H., Nagel, R. and B. Streit (1998), Short-term toxicity of lindane, hexachlorobenzene and copper sulfate on tubificid sludgeworms (Oligochaeta) in artificial media, Ecotox. Environ. Safety, 39: pp. 10-20.

▼**M6**

*Apéndice 4*

**Características químicas aceptables del agua de dilución**

| COMPONENTE | CONCENTRACIONES |
|---|---|
| Partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Dureza como $CaCO_3$ | < 400 mg/l (*) |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

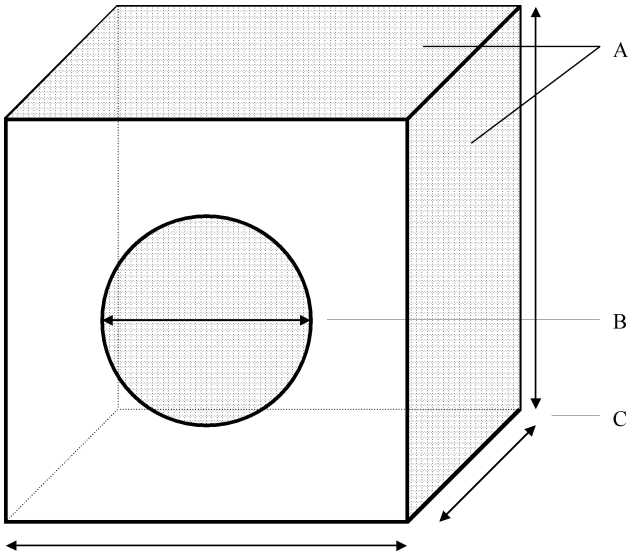
(*) Sin embargo, si se sospecha interacción entre los iones responsables de la dureza y la sustancia problema, debe utilizarse agua menos dura (por tanto, en esta situación no debe emplearse el medio M4 de Elendt).

▼**M6**

*Apéndice 5*

**Orientación sobre los resultados del ensayo**

Ejemplo de una jaula de cría:



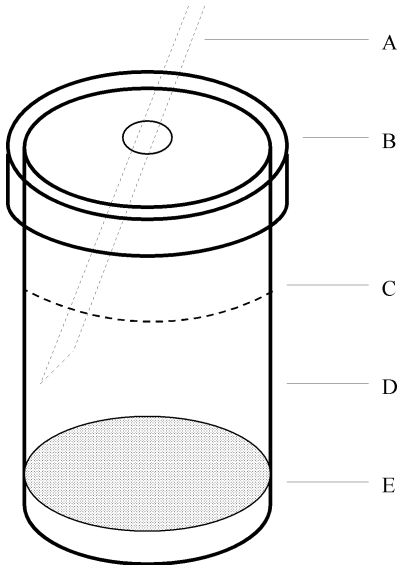

A: Gasa en la parte superior y al menos en uno de los lados de la jaula (luz de malla aproximada de 1 mm).

B: Abertura para colocar los adultos aparecidos en el interior de la jaula de cría y para retirar de los cristalizadores los cordones de huevos puestos (no se muestran en este gráfico).

C: Jaula de cría con un tamaño mínimo de 30 cm de largo, 30 cm de altura y 30 cm de ancho.

▼**M6**

Ejemplo de un recipiente de ensayo:




A: Pipeta Pasteur para el suministro de aire al agua sobrenadante.

B: Tapa de cristal para evitar que se escapen los dípteros aparecidos.

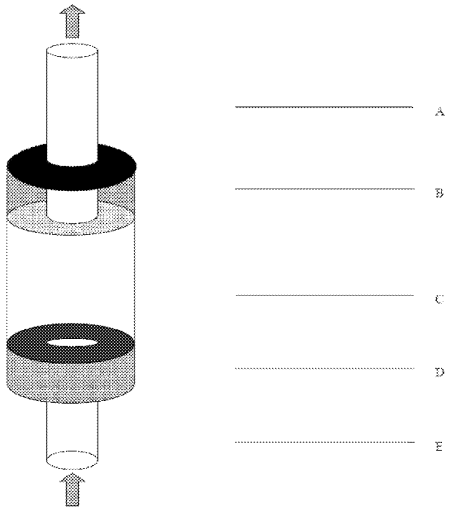
C: Capa de la superficie de agua.

D: Recipiente de ensayo (vaso de vidrio de 600 ml como mínimo).

E: Capa de sedimento.

▼**M6**

Ejemplo de extractor para la captura de dípteros adultos (las flechas indican la dirección del flujo de aire):




A: Tubo de vidrio (diámetro interior de 5 mm aproximadamente) conectado a una bomba de autocebado.

B: Corcho de goma vulcanizada, perforado con el tubo de vidrio (A). En el interior, la abertura del tubo de vidrio (A) se tapa con un poco de algodón y una gasa (luz de la malla de 1 mm aproximadamente) para evitar daños en los dípteros cuando son succionados por el extractor.

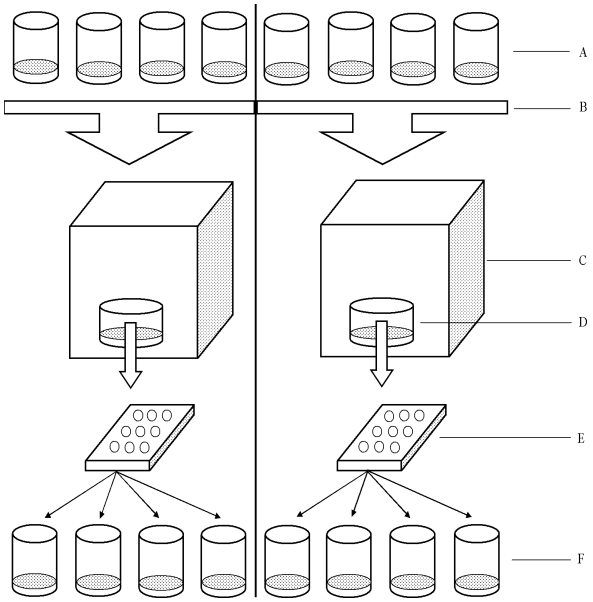
C: Recipiente transparente (de plástico o vidrio, de una longitud aproximada de 15 cm) para los dípteros capturados.

D: Corcho de goma vulcanizada, perforado con el tubo (E). Para soltar los dípteros en la jaula de cría, se retira el corcho D del recipiente C.

E: Tubo (de plástico o vidrio, diámetro interior de 8 mm aproximadamente) para recoger los dípteros adultos del recipiente.

▼**M6**

Presentación esquemática de un ensayo de ciclo de vida:




A: Primera generación: recipientes de ensayo que contienen un sistema de sedimento-agua, ocho réplicas y veinte larvas de primer estadio por recipiente.

B: Cuatro recipientes de ensayo por cada jaula de cría, A y B.

C: Jaulas de cría (A y B) para el enjambrado, el apareamiento y la oviposición.

D: Cristalizadores donde caen los cordones de huevos.

E: Microplacas, un pocillo para cada cordón de huevos.

F: Segunda generación: recipientes de ensayo que contienen un sistema de sedimento-agua, ocho réplicas y veinte larvas de primer estadio por recipiente.

▼M6

## C.41. ENSAYO DE DESARROLLO SEXUAL EN PECES

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 234 de la OCDE (2011). Se basa en una decisión de 1998 de desarrollar nuevos métodos de ensayo, o actualizar métodos existentes, para la selección y evaluación de los alteradores endocrinos potenciales. El ensayo de desarrollo sexual en peces (FSDT) se identificó como un método de ensayo prometedor que abarca una fase de la vida sensible de los peces que responde a sustancias similares a los estrógenos y los andrógenos. El método de ensayo fue sometido a un ejercicio de validación interlaboratorios entre los años 2006 y 2010, en el que se validaron el medaka (*Oryzias latipes*), el pez cebra (*Danio rerio*) y el espinoso (*Gasterosteus aculeatus*); en el caso del pez cabeza gorda (*Pimephales promelas*), este fue validado parcialmente (41) (42) (43). Este protocolo incluye el medaka, el espinoso y el pez cebra. El protocolo constituye, en principio, una mejora de las directrices TG 210 de la OCDE, Ensayo de toxicidad en las primeras fases de vida de los peces (1), donde la exposición continúa hasta que los peces se diferencian sexualmente, es decir, cuando han transcurrido aproximadamente 60 días desde la eclosión (dph), en lo que respecta al medaka japonés, el espinoso y el pez cebra (el periodo de exposición podría ser más corto o más largo para otras especies que pudieran validarse en el futuro), y se añade la observación de efectos sobre el sistema endocrino. El FSDT evalúa los efectos en las primeras fases de la vida, así como las posibles consecuencias negativas de las sustancias sospechosas de alterar el sistema endocrino (por ejemplo, estrógenos, andrógenos e inhibidores de la esteroidogénesis) en relación con el desarrollo sexual. La combinación de los dos parámetros endocrinos principales, la concentración de vitelogenina (VTG) y la proporción de sexos fenotípicos permite que el ensayo indique el mecanismo de acción de la sustancia problema. Debido al cambio relevante para la población de la proporción de sexos fenotípicos, el FSDT se puede utilizar para llevar a cabo evaluaciones de peligros y riesgos. No obstante, si el ensayo se utiliza para evaluar peligros y riesgos, no debe utilizarse el espinoso, porque los datos de validación disponibles hasta el momento reflejan que, en esta especie, las alteraciones de la proporción de sexos fenotípicos debidas a las sustancias problema fueron poco frecuentes.

2. El protocolo se basa en peces expuestos a sustancias a través del agua, durante el periodo lábil sexual en el que se espera que los peces sean más sensibles a los efectos de las sustancias que alteran el sistema endocrino e interfieren en el desarrollo sexual. Se miden dos parámetros principales como indicadores de aberraciones del desarrollo asociadas al sistema endocrino: las concentraciones de VTG y las proporciones de sexos determinadas mediante la histología de las gónadas. La histopatología de las gónadas (evaluación y determinación de fases de los ovocitos y de las células espermatogénicas) es opcional. Además, el sexo genético se determina siempre que sea posible (por ejemplo, en el medaka japonés y en el espinoso). La presencia de un marcador del sexo genético constituye una ventaja considerable, ya que aumenta la potencia de las estadísticas de la proporción de sexos y permite la detección de la inversión de sexo fenotípico del individuo. Otros parámetros principales que deben medirse incluyen la tasa de eclosión, la supervivencia, la longitud y el peso corporal. El método de ensayo podría adaptarse a otras especies distintas a las mencionadas anteriormente, siempre que dichas especies se sometan a una validación igual a la lograda con el medaka japonés, el espinoso y el pez cebra, que los peces de control se diferencien sexualmente al final del ensayo, que los niveles de VTG sean lo suficientemente altos como para detectar las variaciones significativas relacionadas con las sustancias, y que se establezca la sensibilidad del sistema de ensayo mediante sustancias de referencia con actividad endocrina [(anti)estrógenos, (anti)andrógenos, inhibidores de la aromatasa, etc.]. Asimismo, todo informe de validación que haga referencia a datos del FSDT utilizando otras especies debe ser revisado por la OCDE y los resultados de la validación deben considerarse igual de satisfactorios.

▼M6

**Consideraciones iniciales y limitaciones**

3. La VTG se produce normalmente en el hígado de los vertebrados ovíparos hembra como respuesta a los estrógenos endógenos circulantes (2). Es un precursor de las proteínas de la yema de huevo y, una vez que se produce en el hígado, viaja a través del torrente sanguíneo hasta el ovario, donde los huevos en desarrollo la absorben y modifican. La síntesis de la VTG es muy limitada, aunque detectable, en los peces inmaduros y en los peces macho adultos porque no cuentan con suficientes estrógenos circulantes. No obstante, el hígado puede sintetizar y secretar VTG como respuesta a una estimulación de estrógenos exógena (3) (4) (5).

4. La medición de la VTG sirve para detectar las sustancias con mecanismos de acción estrogénicos, antiestrogénicos y androgénicos, así como las sustancias que interfieren con la esteroidogénesis como, por ejemplo, los inhibidores de la aromatasa. La detección de sustancias estrogénicas es posible mediante la medición de la inducción de VTG en los peces macho, algo que ha quedado documentado de forma abundante en la bibliografía revisada por expertos. La inducción de VTG también ha quedado demostrada tras la exposición a andrógenos aromatizables (6) (7). Una reducción del nivel circulante de estrógenos en las hembras, por ejemplo mediante la inhibición de la aromatasa que convierte el andrógeno endógeno en el estrógeno natural 17β-estradiol, provoca una disminución del nivel de concentración de VTG, lo que se utiliza para detectar las sustancias con propiedades inhibidoras de la aromatasa o, más ampliamente, los inhibidores de la esteroidogénesis (33). La relevancia biológica de la respuesta de la VTG tras la administración de estrógenos o la inhibición de la aromatasa ha quedado establecida y se ha documentado ampliamente (8) (9). Sin embargo, es posible que la producción de VTG en las hembras también pueda verse afectada por la toxicidad general y unos mecanismos de acción tóxicos no endocrinos.

5. Se ha conseguido desarrollar varios métodos de medición, que se han armonizado para el uso rutinario para cuantificar la VTG en la sangre, el hígado, todo el cuerpo o en muestras homogeneizadas de cabeza/cola recogidas de distintos peces. Tal es el caso para el pez cebra, el espinoso y el medaka, y también para la especie validada parcialmente, el pez cabeza gorda; están disponibles los métodos de enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) específicos para cada especie, que usan inmunoquímica para la cuantificación de la VTG (5) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). En el medaka y el pez cebra hay una buena correlación entre la VTG medida en el plasma sanguíneo, en el hígado y en las muestras homogeneizadas, aunque estas tienden a presentar unos valores ligeramente inferiores a los plasmáticas (17) (18) (19). En el apéndice 5 se recogen los procedimientos recomendados para la recogida de muestras para el análisis de VTG.

6. El cambio en la proporción de sexos fenotípicos constituye un parámetro que refleja la inversión de sexo. En principio, los estrógenos, los antiestrógenos, los andrógenos, los antiandrógenos y las sustancias inhibidoras de la esteroidogénesis pueden afectar a la proporción de sexos de los peces en desarrollo (20). Se ha demostrado que esta inversión de sexo es parcialmente reversible en el pez cebra (21) tras la exposición a una sustancia similar a los estrógenos, mientras que la inversión de sexo tras una exposición a una sustancia similar a los andrógenos es permanente (30). El sexo se define como hembra, macho, hermafrodita (con ovocitos y células espermatogénicas en una gónada) o indiferenciado, y se determina en cada pez mediante el examen histológico de las gónadas. Se proporciona orientación en el apéndice 7 y en el documento de orientación de la OCDE sobre el diagnóstico de histopatología relacionada con el sistema endocrino de las gónadas de los peces (22).

7. El sexo genético se examina mediante marcadores genéticos cuando están presentes en una especie de pez determinada. En el medaka, los genes XX de la hembra o XY del macho se pueden detectar mediante la reacción en

▼M6

cadena de la polimerasa (PCR), o se puede analizar el gen del dominio DM ligado a Y (DMY, negativo o positivo), tal y como se describe en (23) (24). Con respecto al espinoso hay un método de PCR equivalente para determinar el sexo genético, que se describe en el apéndice 10. Cuando el sexo genético se puede vincular individualmente al sexo fenotípico, la potencia del ensayo mejora y, por lo tanto, el sexo genético debería determinarse en las especies que tengan marcadores documentados del sexo genético.

8. Los dos parámetros endocrinos principales, la VTG y la proporción de sexos, pueden demostrar, en conjunto, el mecanismo de acción (MDA) endocrino de la sustancia (tabla 1). La proporción de sexos constituye un biomarcador relevante para la población (25) (26) y, para algunos mecanismos de acción bien definidos, los resultados del FSDT podrían utilizarse para llevar a cabo evaluaciones de peligros y riesgos, cuando el organismo regulador lo considere conveniente. Estos mecanismos de acción son, en la actualidad, estrógenos, los andrógenos y los inhibidores de la esteroidogénesis.

*Tabla 1*

**Reacción de los parámetros endocrinos a los distintos mecanismos de acción de las sustancias:**

**↑ = aumento, ↓ = disminución, — = no investigado**

| MDA | VTG ♂ | VTG ♀ | Proporción de sexos | Referencias |
|---|---|---|---|---|
| Agonista de estrógenos débil | ↑ | ↑ | ↑♀ o ↑Indif. | (27) (40) |
| Agonista de estrógenos fuerte | ↑ | ↑ | ↑♀ o ↑Indif., sin ♂ | (28) (40) |
| Antagonista de estrógenos | — | — | ↓♀, ↑Indif. | (29) |
| Agonista de andrógenos | ↓ o — | ↓ o — | ↑ ♂, sin ♀ | (28) (30) |
| Antagonista de andrógenos | — | — | ↑♀<br>↑Hermafrodita | (31) |
| Inhibidor de la aromatasa | ↓ | ↓ | ↓♀ | (33) |

9. El FSDT no abarca la fase de vida reproductiva de los peces y, por lo tanto, las sustancias de las que se crea que afectan a la reproducción con unas concentraciones menores que al desarrollo sexual deben evaluarse en un ensayo que abarque la reproducción.

10. Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

11. El FSDT *in vivo* se ha concebido para detectar las sustancias con propiedades androgénicas y estrogénicas, así como con propiedades antiandrogénicas, antiestrogénicas y de inhibición de la esteroidogénesis. Las fases de validación del FSDT (1 y 2) abarcaban las sustancias estrogénicas, androgénicas e inhibidoras de la esteroidogénesis. Los efectos de los antagonistas de estrógenos y andrógenos en el FSDT se pueden consultar en la tabla 1, pero estos MDA están menos documentados en la actualidad.

**PRINCIPIO DEL ENSAYO**

12. En el ensayo se exponen los peces, desde el huevo recién fertilizado hasta que finaliza la diferenciación sexual, a al menos tres concentraciones de la sustancia problema disuelta en agua. Las condiciones del ensayo deben ser dinámicas, a menos que no sea posible debido a la disponibilidad o al carácter de la sustancia problema (por ejemplo, una solubilidad limitada). El ensayo comienza con la colocación de huevos recién fertilizados (antes de la segmentación del blastodisco) en las cámaras del ensayo. La carga de las cámaras se describe, para cada especie, en el punto 27. En lo que respecta a las especies de peces validadas, el medaka, el espinoso y el pez cebra, el ensayo termina el día 60 después de la eclosión. Cuando finaliza el ensayo, todos los peces son sacrificados sin crueldad. Se recoge

▼M6

una muestra biológica (plasma sanguíneo, hígado u homogeneizado de cabeza/cola) para realizar el análisis de VTG de cada pez y la parte restante se fija para llevar a cabo la evaluación histológica de las gónadas, a fin de determinar el sexo fenotípico; opcionalmente, se puede llevar a cabo la evaluación histopatológica (por ejemplo, fases de las gónadas, grado de hermafroditismo). En las especies que presentan los marcadores adecuados (apéndices 9 y 10), se recoge una muestra biológica (la aleta anal o dorsal) a fin de determinar el sexo genético.

13. En el apéndice 2 se puede consultar un resumen de las condiciones relevantes del ensayo específicas para las especies validadas: medaka, espinoso y pez cebra.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

14. Deben estar disponibles los resultados de un ensayo de toxicidad aguda u otro ensayo de toxicidad a corto plazo [por ejemplo, el método de ensayo C.14 (34) y las TG 210 de la OCDE (1)], realizados preferiblemente con las especies seleccionadas para este ensayo. Esto implica que la hidrosolubilidad y la presión de vapor de la sustancia problema sean conocidas y que haya disponible un método analítico fiable, cuyo límite de detección y precisión sean conocidos y figuren en el informe, para calcular la cantidad de sustancia en las cámaras del ensayo.

15. Otra información útil incluye la fórmula estructural de la sustancia, su pureza, su estabilidad en el agua y a la luz, pKa, $P_{ow}$ y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (método de ensayo C.4) (35).

**Criterios de aceptación del ensayo**

16. Para que los resultados del ensayo sean aceptables, deben cumplirse las condiciones siguientes:

— la concentración de oxígeno disuelto debe ser, como mínimo, del 60 % del valor de saturación de aire (ASV) a lo largo del ensayo;

— en ningún momento del periodo de exposición la temperatura del agua debe variar en más de ± 1,5 °C entre las cámaras de ensayo y siempre debe mantenerse dentro de los intervalos de temperatura especificados para la especie sometida a ensayo (apéndice 2);

— debe haber disponible un método validado para el análisis de la sustancia problema con un límite de detección muy por debajo de la concentración nominal mínima, y deben recopilarse pruebas para demostrar que las concentraciones de la sustancia problema en la solución se han mantenido de forma satisfactoria dentro de aproximadamente el ±20 % de los valores medios medidos;

— la tasa global de supervivencia de los huevos fertilizados en los controles y, en su caso, en los controles de disolvente, ha de ser superior o igual a los límites establecidos en el apéndice 2;

— los criterios de aceptación relativos al crecimiento y a las proporciones de sexos al finalizar el ensayo se basan en los datos procedentes de los grupos de control (control de disolvente y control de agua combinados, a menos que sean muy diferentes; en ese caso, solo el de disolvente):

▼M6

| | | Medaka | Pez cebra | Espinoso |
|---|---|---|---|---|
| Crecimiento | Peso húmedo del pez, secado con material absorbente | > 150 mg | > 75 mg | > 120 mg |
| | Longitud (longitud estándar) | > 20 mm | > 14 mm | > 20 mm |
| Proporción de sexos (% de machos o hembras) | | 30-70 % | 30-70 % | 30-70 % |

— Cuando se utiliza un disolvente, no deben apreciarse efectos significativos en la supervivencia ni efectos alteradores del sistema endocrino ni otros efectos adversos en las primeras fases de la vida en el estudio de un control de disolvente.

Si se observa una desviación de los criterios de aceptación del ensayo, se deben tener en cuenta las consecuencias en relación con la fiabilidad de los datos del ensayo y dichas consideraciones deben incluirse en el informe.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

**Cámaras de ensayo**

17. Se puede utilizar cualquier tipo de cámara de vidrio, acero inoxidable u otro material químicamente inerte. Las dimensiones de las cámaras deben ser suficientes para que se cumplan los criterios de carga que se indican más adelante. Se recomienda colocar las cámaras de ensayo de forma aleatoria en la zona donde se lleve a cabo el ensayo. Se prefiere un diseño aleatorio de bloques, con todas las concentraciones presentes en cada bloque, a un diseño totalmente aleatorio. Las cámaras de ensayo han de protegerse de toda perturbación no deseada.

**Selección de las especies**

18. En el apéndice 2 figura una lista de especies recomendadas. En el apartado 2 se encuentran los procedimientos de inclusión de las nuevas especies.

**Mantenimiento de los peces parentales**

19. En las TG 210 de la OCDE (1) se puede consultar la información relativa al mantenimiento de los peces parentales en condiciones satisfactorias. Los peces parentales deben recibir alimentos adecuados una o dos veces al día.

**Manipulación de los embriones y las larvas**

20. Inicialmente, los embriones y las larvas pueden quedar expuestos, dentro de una cámara principal, en cámaras más pequeñas de vidrio o acero inoxidable, con laterales o extremos de malla para permitir el flujo de la sustancia problema por toda la cámara. Puede provocarse un flujo no turbulento a través de estas pequeñas cámaras, suspendiéndolas de un brazo que las desplace en sentido vertical, pero de manera que los organismos permanezcan siempre sumergidos.

21. Si se utilizan cubetas, rejillas o mallas para mantener los huevos en la cámara principal de ensayo, deben retirarse después de la eclosión de las larvas, pero deben conservarse las mallas para impedir que los peces se escapen. Si hubiera que transferir las larvas, no deben quedar expuestas al aire y no deben utilizarse redes para retirar los peces de los contenedores de los huevos. El momento de dicho traslado varía según la especie y no siempre es necesario.

▼M6

**Agua**

22. Es adecuada para el ensayo toda agua en la que la especie de ensayo demuestre una supervivencia de los controles tan buena al menos como en el agua descrita en el apéndice 3. Su calidad ha de ser constante a lo largo de todo el ensayo. Deben tomarse muestras periódicamente para el análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por reacción con la sustancia problema) ni afecta negativamente al comportamiento de los peces reproductores. Hay que medir el carbono orgánico total, la conductividad, el pH y los sólidos en suspensión, por ejemplo cada tres meses, cuando se sepa que el agua de dilución tiene una calidad relativamente constante. Si se cuestiona la calidad del agua, deben llevarse a cabo mediciones de metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, $Cl^{-}$, $SO_4^{2-}$) y plaguicidas. En el punto 34 se puede consultar información detallada sobre el análisis de las sustancias y la recogida del agua.

**Soluciones de ensayo**

23. Si es posible en la práctica, debe utilizarse un sistema dinámico. Para los ensayos dinámicos se requiere un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre de la sustancia problema (por ejemplo, bomba dosificadora, diluidor proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en las cámaras de ensayo. Los caudales de las soluciones madre y del agua de dilución deben comprobarse con regularidad durante el ensayo y no deberían variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Se considera adecuado un caudal equivalente al menos a cinco veces el volumen de las cámaras de ensayo cada 24 horas (1). Debe tenerse cuidado para evitar el uso de tubos de plástico u otros materiales que pudieran contener sustancias biológicamente activas o que pudieran adsorber la sustancia problema.

24. La solución madre se prepara preferiblemente sin utilizar disolventes, por simple mezcla o agitación mecánica de la sustancia problema en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Si la sustancia problema resulta difícil de disolver en agua, deben seguirse los procedimientos descritos en el documento de orientación de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas problemáticas (36). Debe evitarse el uso de disolventes, pero en algunos casos pueden ser necesarios para obtener una solución madre con la concentración deseada. En (36) se dan ejemplos de disolventes adecuados.

25. Deben evitarse las condiciones semiestáticas en el ensayo, a menos que se proporcione una justificación por motivos apremiantes relacionados con la sustancia problema (por ejemplo, estabilidad, disponibilidad limitada, coste elevado o peligro). En la técnica semiestática pueden seguirse dos procedimientos de renovación distintos. Se pueden preparar nuevas soluciones de ensayo en cámaras limpias y, con cuidado, transferir los huevos y las larvas supervivientes a las nuevas cámaras, o se pueden retener los organismos del ensayo en las cámaras de ensayo mientras se cambia cada día una parte (dos tercios como mínimo) del agua del ensayo.

PROCEDIMIENTO

**Condiciones de exposición**

*Recogida de huevos y duración*

26. Para evitar sesgos genéticos, se recogen huevos de, como mínimo, tres parejas o grupos reproductores, que se mezclan y se seleccionan aleatoriamente para iniciar el ensayo. En lo que respecta al espinoso, véase la descripción de la fertilización artificial incluida en el apéndice 11. El ensayo

▼M6

debe comenzar lo antes posible una vez fertilizados los huevos; preferiblemente, los embriones se sumergen en las soluciones de ensayo antes de que empiece la segmentación del blastodisco o lo antes posible después de esta fase, y a más tardar a las 12 horas de la fertilización. El ensayo debe continuar hasta finalizar la diferenciación sexual en el grupo de control (60 días después de la eclosión en el caso del medaka, el espinoso y el pez cebra).

*Carga*

27. El número de huevos fertilizados al principio del ensayo debe ser, como mínimo, de 120 por concentración, dividido entre un mínimo de 4 réplicas (se acepta la asignación de raíces cuadradas al control). Los huevos deben distribuirse de forma aleatoria (mediante tablas estadísticas para aleatorización) entre los tratamientos. La tasa de carga (véase la definición en el apéndice 1) debe ser lo suficientemente baja como para mantener una concentración de oxígeno disuelto del 60 % del ASV como mínimo, sin una ventilación directa de las cámaras. En los ensayos dinámicos, se recomienda una tasa de carga que no supere los 0,5 g/l en 24 horas ni los 5 g/l de solución en ningún momento. A más tardar 28 días después de la fertilización, debe volver a distribuirse el número de peces por réplica, de forma que cada réplica contenga un número de peces lo más similar posible. Si se produce mortalidad relacionada con la exposición, el número de réplicas debe reducirse de forma adecuada para que la densidad de peces de los distintos niveles de tratamiento se mantenga lo más similar posible.

*Luz y temperatura*

28. El fotoperiodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada en el ensayo (en el apéndice 2 se pueden consultar las condiciones experimentales del FSDT).

*Alimentación*

29. El alimento y su suministro son vitales y es esencial que se suministre el alimento correcto para cada fase en los intervalos adecuados y en un nivel suficiente para facilitar el crecimiento normal. La alimentación debe ser *ad libitum*, minimizando el excedente. Para obtener una tasa de crecimiento suficiente, los peces deben ser alimentados al menos dos veces al día (se acepta una vez al día durante los fines de semana), y las tomas deben estar separadas como mínimo por tres horas. El alimento sobrante y las heces deben retirarse, según resulte necesario, para evitar que se acumulen los residuos. Conforme se vaya ganando experiencia, el alimento y los regímenes alimentarios se ajustarán continuamente para mejorar la supervivencia y optimizar el crecimiento. Por lo tanto, se debe hacer lo posible por confirmar el régimen propuesto con expertos reconocidos. La alimentación debe detenerse 24 horas antes del fin del ensayo. En el apéndice 2 se incluye una lista de ejemplos de alimentos apropiados [véase también el Marco de ensayos con peces de la OCDE (39)].

**Concentraciones de ensayo**

30. Las concentraciones de la sustancias problema deben separarse tal y como se indica en el apéndice 4. Deben utilizarse, como mínimo, tres concentraciones del ensayo en al menos cuatro réplicas. Para seleccionar el intervalo de concentraciones de ensayo debe tenerse presente la curva que relaciona la $LC_{50}$ con el periodo de exposición de los estudios de toxicidad aguda disponibles. Se recomienda usar cinco concentraciones de ensayo si los datos van a utilizarse en evaluaciones de riesgos.

31. No es preciso someter a ensayo concentraciones de la sustancia superiores al 10 % de la $LC_{50}$ adulta aguda, o 10 mg/l, si esta es más baja. La concentración máxima del ensayo debe ser del 10 % de la $LC_{50}$ en la fase de vida juvenil o larvaria.

▼M6

**Controles**

32. Debe llevarse a cabo un control de agua de dilución (≥ 4 réplicas) y, si procede, un control de disolvente (≥ 4 réplicas), además de las concentraciones de ensayo. Solo deben utilizarse en el ensayo los disolventes investigados que hayan demostrado no provocar ninguna influencia estadísticamente significativa en los parámetros del ensayo.

33. Cuando se utilice un disolvente, su concentración final no debe ser superior a 0,1 ml/l (36) y en todas las cámaras del ensayo debe haber la misma concentración, salvo en el control de agua de dilución. No obstante, se debe hacer todo lo posible por evitar el uso de dicho disolvente, o mantener las concentraciones del disolvente al mínimo.

**Frecuencia de las mediciones y de las determinaciones analíticas**

34. El análisis químico de la concentración de la sustancia problema debe llevarse a cabo antes de comenzar el ensayo para comprobar su conformidad con los criterios de aceptación. Todas las réplicas deben analizarse individualmente al principio y al final del ensayo. Una réplica por concentración de ensayo se debe analizar al menos una vez a la semana durante el ensayo, cambiando sistemáticamente entre las réplicas (1, 2, 3, 4, 1, 2…). Si las muestras se guardan para analizarlas posteriormente, debe validarse previamente el método de almacenamiento de las muestras. Las muestras deben filtrarse (por ejemplo, con un tamaño de poro de 0,45 μm) o centrifugarse para garantizar que las determinaciones se realicen con la sustancia en una solución verdadera.

35. Durante el ensayo, deben medirse el oxígeno disuelto, el pH, la dureza total, la conductividad, la salinidad (si procede) y la temperatura en todas las cámaras del ensayo. Como mínimo, el oxígeno disuelto, la salinidad (si procede) y la temperatura deben medirse cada semana, y el pH, la conductividad y la dureza deben medirse al principio y al final del ensayo. La temperatura debe someterse, preferiblemente, a un control continuo al menos en una cámara de ensayo.

36. Los resultados deben basarse en concentraciones medidas. Sin embargo, si la concentración de la sustancia problema en la solución se ha mantenido debidamente dentro de ± 20 % de la concentración nominal durante todo el ensayo, los resultados pueden basarse en los valores nominales o en los valores medidos.

**Observaciones y mediciones**

*Fase de desarrollo embrionario*

37. La exposición debe comenzar lo antes posible después de la fertilización y antes de la segmentación del blastodisco, a más tardar a las 12 horas de la fertilización, para garantizar la exposición durante el desarrollo temprano de los embriones.

*Eclosión y supervivencia*

38. Al menos una vez al día deben observarse y contarse las eclosiones y los supervivientes. Los embriones, las larvas y los peces juveniles muertos deben retirarse en cuanto se observen, ya que pueden descomponerse rápidamente y pueden ser destruidos por las acciones del resto de peces. Dicha retirada ha de hacerse con sumo cuidado para no tocar ni dañar físicamente los huevos y larvas adyacentes, pues son extremadamente delicados y sensibles. Los criterios para considerar que un organismo está muerto varían según la fase del desarrollo:

— Huevos: sobre todo en las fases más tempranas, disminución acusada de translucidez y cambio de la coloración debido a la coagulación y/o precipitación de proteínas, que les da un aspecto blanco opaco.

▼M6

— Larvas y peces juveniles: inmovilidad o ausencia de movimiento respiratorio o ausencia de latido cardiaco o coloración blanca opaca del sistema nervioso central o ausencia de reacción a los estímulos mecánicos.

*Aspecto anómalo*

39. El número de larvas o peces que presenten anomalías en la forma del cuerpo debe quedar registrado y deben describirse el aspecto y la naturaleza de la anomalía. Cabe señalar que la presencia de larvas y embriones anómalos se da en condiciones normales y que su proporción puede alcanzar varias unidades porcentuales en los controles de algunas especies. Los animales que presenten anomalías solo deben retirarse de las cámaras de ensayo cuando estén muertos. No obstante, de conformidad con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, si las anomalías provocan dolor, sufrimiento y angustia o daño duradero, y se puede prever de manera fiable la muerte, los animales deben ser anestesiados y sacrificados de acuerdo con la descripción del punto 44 y tratados como parte de la mortalidad en lo que respecta al análisis de datos.

*Comportamiento anómalo*

40. Las anomalías como, por ejemplo, la hiperventilación, la natación descoordinada, la inactividad atípica y el comportamiento atípico en la alimentación, deben registrarse en el momento de su aparición.

*Peso*

41. Al final del ensayo deben sacrificarse todos los peces supervivientes (se anestesiarán si hubiera que recoger muestras de sangre) y debe medirse el peso húmedo individual (secado con material absorbente).

*Longitud*

42. Al final del ensayo deben medirse las longitudes individuales (longitud estándar).

43. Estas observaciones se traducirán en la disponibilidad de algunos o de la totalidad de los datos siguientes para elaborar los informes:

— mortalidad acumulativa;

— número de peces sanos al final del ensayo;

— tiempo de inicio y fin de la eclosión;

— longitud y peso de los animales supervivientes;

— número de peces deformes;

— número de larvas que presenten un comportamiento anómalo.

**Muestreo de peces**

44. El muestreo de peces se lleva a cabo al finalizar el ensayo. Los peces de la muestra deben ser sacrificados con, por ejemplo, MS-222 (100-500 mg por litro, tamponado con 200 mg de $NaHCO_3$ por litro) o FA-100 (4-alil-2-metoxifenol: eugenol), y deben medirse y pesarse individualmente con su peso húmedo (secados con material absorbente), o deben anestesiarse si hay que recoger una muestra de sangre (véase el punto 49).

**Muestreo para el análisis de VTG y la determinación del sexo mediante evaluación histológica**

45. Se debe hacer un muestreo de todos los peces y prepararlos para analizar el sexo y la VTG. Todos los peces deben analizarse histológicamente para determinar el sexo. En lo que respecta a las mediciones de VTG, se acepta

▼M6

un submuestreo de, como mínimo, dieciséis peces de cada réplica. Si los resultados del submuestreo no resultan claros, debe analizarse la VTG de más peces.

46. El procedimiento de muestreo para el análisis de VTG y la determinación del sexo depende del método de análisis de la VTG:

*Método del homogeneizado de cabeza/cola para el análisis de la VTG*

47. Los peces son sacrificados. Se separan la cabeza y la cola del cuerpo de cada pez, haciendo cortes con un bisturí justo detrás de las aletas pectorales y justo detrás de la aleta dorsal (véase la figura 1). Las partes de la cabeza y de la cola de cada pez se agrupan, se pesan y se numeran individualmente, se congelan en nitrógeno líquido y se conservan a – 70 °C o menos para realizar el análisis de la VTG. La parte del cuerpo del pez se numera y se fija con un fijador adecuado para realizar la evaluación histológica (22). Con este método se evalúan la VTG y la histopatología de cada individuo y, de esta forma, se puede relacionar un posible cambio en el nivel de VTG con el sexo fenotípico del pez o con su sexo genético (medaka y espinoso). Para obtener más información, consulte las orientaciones sobre homogeneización (apéndice 5) y las orientaciones sobre cuantificación de la VTG (apéndice 6).

*Método del homogeneizado de hígado para el análisis de la VTG*

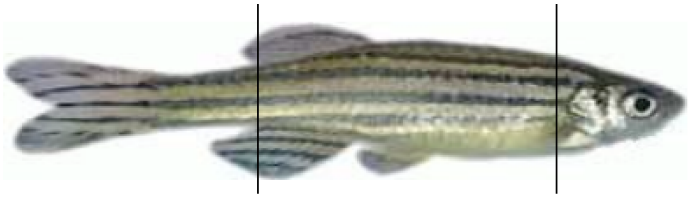
48. Los peces son sacrificados. El hígado se extrae mediante disección y se conserva a una temperatura igual o inferior a – 70 °C. Los procedimientos recomendados para la extirpación y el tratamiento previo del hígado están disponibles en las TG 229 de la OCDE (37) o en el capítulo C.37 de este anexo (38). A continuación, los hígados se homogeneizan individualmente tal y como se describe en las TG 229 de la OCDE o en el capítulo C.37 de este anexo. El sobrenadante recogido se utiliza para medir la VTG con una técnica ELISA homóloga [en el apéndice 6 se puede consultar un ejemplo de cuantificación en el pez cebra, o en las TG 229 de la OCDE (37) con respecto al medaka]. De acuerdo con este planteamiento, también se pueden tener datos de peces individuales tanto sobre la VTG como sobre la histología de las gónadas.

*Método del plasma sanguíneo para el análisis de la VTG*

49. Se recoge sangre de los peces anestesiados mediante punción cardiaca, a través de la vena caudal o con un corte de la cola, y se centrifuga a 4 °C para recoger el plasma. El plasma se conserva a una temperatura igual o inferior a – 70 °C hasta que se utilice. Se sacrifica el pez completo y se fija para evaluar la histología. Tanto las muestras de plasma como los peces se numeran individualmente para relacionar los niveles de VTG con el sexo de los peces.

*Figura 1*

**Corte de un pez para medir la VTG en un homogeneizado de cabeza/cola y realizar la evaluación histológica de la parte central**



▼M6

*Determinación del sexo genético*

50. Se recoge una muestra biológica para determinar el sexo genético de peces individuales en las especies que presentan los marcadores adecuados. En lo que respecta al medaka, se recoge la aleta anal o la aleta dorsal. En el apéndice 9 se ofrece una descripción detallada, incluyendo el muestreo de tejido y la determinación del sexo mediante un método de PCR. Igualmente, en lo que respecta al espinoso, en el apéndice 10 se incluye una descripción del muestreo de tejido y un método de PCR para determinar el sexo.

**Medición de la VTG**

51. La medición de la VTG debe basarse en un método cuantitativo y validado analíticamente. Debe disponerse de información sobre la variabilidad intraensayo e interensayo del método utilizado en un laboratorio determinado. El origen de la variabilidad interlaboratorio e intralaboratorio se basa (probablemente) en las distintas fases de desarrollo de la población de peces. Teniendo en cuenta la variabilidad de la medición de la VTG, las NOEC que se basen únicamente en este parámetro deben tratarse con mucha atención. Hay varios métodos disponibles para evaluar la producción de VTG en las especies de peces consideradas en este ensayo. Una técnica de medición que resulta tanto relativamente sensible como específica consiste en la determinación de las concentraciones de proteínas mediante un enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Deben utilizarse anticuerpos homólogos (que se generan contra la VTG de la misma especie) y los patrones homólogos más importantes.

**Determinación del sexo**

52. En función del procedimiento de muestreo de la VTG, el pez entero o la parte central restante de cada pez se coloca en un casete de procesamiento previamente etiquetado y se fija con un fijador adecuado para la determinación histológica del sexo (también, opcionalmente, para la determinación de las fases de las gónadas). En el apéndice 7 y en el documento de orientación de la OCDE sobre el diagnóstico de la histopatología relacionada con el sistema endocrino de las gónadas de los peces (22) se proporciona orientación sobre la fijación y la inclusión. Tras el procesamiento, los peces se incluyen en bloques de parafina. Los individuos deben colocarse longitudinalmente en el bloque de parafina. De cada individuo se toman, como mínimo, seis secciones longitudinales (de 3-5 μm de grosor), en un plano frontal, incluyendo tejido de ambas gónadas. El intervalo entre estas secciones debe ser, aproximadamente, de 50 μm en los machos, y de 250 μm en las hembras. No obstante, como cada bloque contendrá, a menudo, tanto machos como hembras (si se incorpora más de un individuo a cada bloque), el intervalo entre las secciones de estos bloques debe ser aproximadamente de 50 μm, hasta que se obtengan al menos seis secciones de las gónadas de cada macho. Posteriormente, el intervalo entre las secciones puede aumentarse hasta unos 250 μm en las hembras. Las secciones se tiñen con hematoxilina y eosina, y se examinan con un microscopio óptico centrándose en el sexo (macho, hembra, hermafrodita o indiferenciado). El hermafroditismo se define como la presencia de más de un ovocito en los testículos por cada grupo de seis secciones analizadas, o de células espermatogénicas (sí/no) en los ovarios. La histopatología y la determinación de las fases de los ovarios y los testículos son opcionales pero, si se investigan, los resultados deben analizarse estadísticamente y registrarse. Cabe señalar que algunas especies de peces, de forma natural, no cuentan con un par de gónadas desarrolladas completamente y es posible que solo haya una gónada presente (por ejemplo, el medaka y, ocasionalmente, el pez cebra). Todas las observaciones deben quedar registradas.

53. La determinación del sexo genético en cada medaka se basa en la presencia o ausencia del gen de determinación del sexo masculino del medaka, DMY, que se encuentra en el cromosoma Y. El sexo genotípico del medaka se puede identificar secuenciando el gen DMY del ADN extraído de, por ejemplo, un trozo de aleta anal o aleta dorsal. La presencia de DMY indica un individuo XY (macho), sea cual sea el fenotipo, mientras que la ausencia de DMY

▼M6

indica un individuo XX (hembra), sea cual sea el fenotipo (23). En el apéndice 9 se incluyen orientaciones sobre la preparación del tejido y el método de PCR. La determinación del sexo genético en el espinoso se realiza también mediante un método de PCR, que se describe en el apéndice 10.

54. Debe indicarse la aparición de hermafroditismo (su definición se puede consultar en el apéndice 1).

**Características sexuales secundarias**

55. Las características sexuales secundarias están controladas por el sistema endocrino en especies como el medaka; por lo tanto, deben realizarse, si es posible, observaciones del aspecto físico de los peces al final de la exposición. En el medaka, la formación papilar en la parte posterior de la aleta anal de las hembras es sensible a los andrógenos. En el capítulo C.37 de este anexo (38) se incluyen fotografías relevantes de los caracteres sexuales secundarios de los machos y de hembras androgenizadas.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

56. Es importante que la prueba estadística válida más fuerte determine el parámetro. La réplica es la unidad experimental, pero la variabilidad dentro de las réplicas debe incluirse en las pruebas estadísticas. En el apéndice 8 se ha incluido un diagrama de flujo de decisiones como ayuda para determinar la prueba estadística más adecuada que debe utilizarse con arreglo a las características de los datos obtenidos del ensayo. El nivel de significación estadística es de 0,05 para todos los parámetros incluidos.

**Proporciones de sexos y sexo genético**

57. Las proporciones de sexos deben analizarse para determinar el efecto significativo (planteamiento de NOEC/LOEC) de la exposición mediante Jonckheere-Terpstra (prueba de tendencia) si existe una relación dosis-respuesta monótona. Si no se encuentra monotonicidad, debe aplicarse una prueba entre pares: se debe utilizar la prueba de Dunnett si se pueden obtener la normalidad y la varianza homogénea. Se debe utilizar Tamhane-Dunnett si hay varianza heterogénea. De lo contrario, se debe utilizar la prueba exacta de Mann-Whitney con el ajuste de Bonferroni-Holm. En el apéndice 8 hay un diagrama de flujo que describe las pruebas estadísticas de las proporciones de sexos. Las proporciones de sexos deben presentarse en tablas, en forma de proporciones de concentraciones ± DT de machos, hembras, hermafroditas e indiferenciados. Se debe destacar la significación estadística. En el informe de validación de la fase 2 del FSDT (42) figuran algunos ejemplos. El sexo genético debe indicarse en forma de porcentaje de inversión del sexo fenotípico en machos, hembras, hermafroditas e indiferenciados.

**Concentraciones de VTG**

58. Las concentraciones de VTG deben analizarse para establecer el efecto significativo (planteamiento de NOEC/LOEC) de la exposición. La prueba de Dunnett es preferible a la prueba t con corrección de Bonferroni. Cuando se utilice una corrección de Bonferroni, se prefiere la corrección de Bonferroni-Holm. Debe tenerse en cuenta la posibilidad de transformación logarítmica de la VTG para lograr la homogeneidad de la varianza y la normalidad. A continuación, si la relación concentración-respuesta es coherente con la monotonicidad, la prueba de Jonckheere-Terpstra será preferible a cualquiera de las pruebas mencionadas anteriormente. Si se utilizan pruebas t o la prueba de Dunnett, no es necesario realizar una prueba F de significación de ANOVA para continuar. Se puede obtener más información en el

▼M6

diagrama de flujo del apéndice 8. Los resultados deben indicarse en tablas, en forma de medias de concentración ± DT para machos, hembras, hermafroditas e indiferenciados, por separado. Debe resaltarse la significación estadística de las hembras fenotípicas y los machos fenotípicos. En el informe de validación de la fase 2 del FSDT (42) figuran algunos ejemplos.

**Concentraciones reales de la sustancia problema**

59. Las concentraciones reales en las cámaras de la sustancia problema deben analizarse a las frecuencias descritas en el punto 34. Los resultados deben indicarse en tablas en forma de concentración media ± DT sobre la base de las réplicas, así como sobre la de las concentraciones, con información sobre el número de muestras y resaltando los valores atípicos respecto a concentración media del tratamiento ± 20 %. En el informe de validación de la fase 2 del FSDT (42) se pueden consultar ejemplos.

**Interpretación de los resultados**

60. Los resultados del ensayo deben interpretarse con prudencia cuando las concentraciones medidas de la sustancia problema en las soluciones del ensayo se aproximen a los límites de detección del método de análisis.

**Informe del ensayo**

61. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema*

— Propiedades físicas y químicas relevantes; identificación química, datos que incluyan la pureza y el método de análisis para la cuantificación de la sustancia problema.

*Condiciones de ensayo*

— Procedimiento de ensayo utilizado (por ejemplo, renovación dinámica o semiestática); diseño del ensayo, incluyendo las concentraciones de ensayo, método de preparación de las soluciones madre (en un anexo), frecuencia de renovación (cuando se usen, deben indicarse el agente solubilizante y su concentración).

— Concentraciones de ensayo nominales, medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas en las cámaras de ensayo, así como el método mediante el cual se hayan logrado (el método de análisis utilizado debe presentarse en un anexo); prueba de que las mediciones corresponden a las concentraciones de la sustancia problema en solución verdadera.

— Calidad del agua en las cámaras de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto.

— Información detallada sobre la alimentación (por ejemplo, tipo de alimentos, origen, cantidad suministrada y frecuencia) y análisis de los contaminantes, si fueran relevantes (por ejemplo, PCB, HAP y plaguicidas organoclorados).

*Resultados*

— Prueba de que los controles satisfacen los criterios de validez: los datos sobre la tasa de eclosión deben presentarse en tablas, en forma de porcentaje por réplica y por concentración. Deben destacarse los valores atípicos respecto a los criterios de aceptación (en los controles). La supervivencia debe presentarse en forma de porcentaje por réplica y por concentración. Deben destacarse los valores atípicos de los criterios de validez (en los controles).

— Deben indicarse claramente los resultados obtenidos con los distintos parámetros observados: supervivencia de los embriones y éxito de la eclosión; anomalías externas; longitud y peso; mediciones de la VTG

▼M6

(ng/g de homogeneizado, ng/ml de plasma o ng/mg de hígado); histología de las gónadas, proporción de sexos, datos sobre el sexo genético; incidencia de cualquier reacción inusual de los peces y cualquier efecto visible producido por la sustancia problema.

62. Los resultados deben presentarse en forma de valores medios ± desviación típica (DT) o error típico (EE). La estadística debe indicarse, como mínimo, en forma de NOEC y LOEC e intervalos de confianza. Debe respetarse el diagrama de flujo estadístico (apéndice 8).

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (1992), *Fish, Early Life Stage Toxicity Test,* Test Guideline Nº 210, Guidelines for the Testing of Chemicals, OCDE, París.

(2) Jobling, S., D. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen and J.P. Sumpter, 1996, «Inhibition of testicular growth in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals», Environmental Toxicology and Chemistry 15, pp. 194-202.

(3) Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995, «Vitellogenesis As A Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment», Environmental Health Perspectives 103, pp. 173-178.

(4) Tyler, C.R., R.van Aerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix and H. Trip (1999), «An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin», Environmental Toxicology and Chemistry 18, pp. 337-347.

(5) Holbech, H., L. Andersen, G.I. Petersen, B. Korsgaard, K.L. Pedersen and P. Bjerregaard (2001a), «Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (Danio rerio)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 130, pp. 119-131.

(6) Andersen, L., P. Bjerregaard and B. Korsgaard (2003), «Vitellogenin induction and brain aromatase activity in adult male and female zebrafish exposed to endocrine disrupters», Fish Physiology and Biochemistry 28, pp. 319-321.

(7) Orn, S., H. Holbech, T.H. Madsen, L. Norrgren and G.I. Petersen (2003), «Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (Danio rerio) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone», Aquatic Toxicology 65, pp. 397-411.

(8) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Lange, C.M. Lye, J.P. Sumpter, M. Zerulla and C.R. Tyler (2002), «Utility of a juvenile fathead minnow screening assay for detecting (anti-)estrogenic substances», Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 319-326.

(9) Sun, L.W., J.M. Zha, P.A. Spear and Z.J. Wang (2007), «Toxicity of the aromatase inhibitor letrozole to Japanese medaka (Oryzias latipes) eggs, larvae and breeding adults», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 533-541.

(10) Parks, L.G., A.O. Cheek, N.D. Denslow, S.A. Heppell, J.A. McLachlan, G.A. LeBlanc and C.V.Sullivan (1999), «Fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 123, pp. 113-125.

(11) Brion, F., B.M. Nilsen, J.K. Eidem, A. Goksoyr and J.M. Porcher (2002), «Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (Danio rerio)», Environmental Toxicology and Chemistry 21, pp. 1699-1708.

(12) Nishi, K., M. Chikae, Y. Hatano, H. Mizukami, M. Yamashita, R. Sakakibara and E. Tamiya (2002), «Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (Oryzias latipes) vitellogenin», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 132, pp. 161-169.

(13) Hahlbeck, E., I. Katsiadaki, I. Mayer, M. Adolfsson-Erici, J. James and B.E. Bengtsson (2004), «The juvenile three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) as a model organism for endocrine disruption — II — kidney

▼**M6**

hypertrophy, vitellogenin and spiggin induction», Aquatic Toxicology 70, pp. 311-326.

(14) Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita, and T. Iguchi (2004), «Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka», Journal of Health Science 50, pp. 301-308.

(15) Eidem, J.K., H. Kleivdal, K. Kroll, N. Denslow, R. van Aerle, C. Tyler, G. Panter, T. Hutchinson and A. Goksoyr (2006), «Development and validation of a direct homologous quantitative sandwich ELISA for fathead minnow (Pimephales promelas) vitellogenin. Aquatic Toxicology», 78, pp. 202-206.

(16) Jensen, K.M. and G.T. Ankley (2006), «Evaluation of a commercial kit for measuring vitellogenin in the fathead minnow (Pimephales promelas)», Ecotoxicology and Environmental Safety 64, pp. 101-105.

(17) Holbech, H., Petersen, G. I., Norman, A., Örn, S, Norrgren, L. and Bjerregaard, P (2001b), «Suitability of zebrafish as test organism for detection of endocrine disrupting chemicals. Comparison of vitellogenin in plasma and whole body homogenate from zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)», Consejo de Ministros Nórdico, TemaNord 2001:597, pp. 48-51.

(18) Nilsen, B.M., K. Berg, J.K. Eidem, S.I. Kristiansen, F. Brion, J.M. Porcher and A. Goksoyr (2004), «Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening», Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, pp. 621-633.

(19) Orn, S., S. Yamani, and L. Norrgren (2006), «Comparison of vitellogenin induction, sex ratio, and gonad morphology between zebrafish and Japanese medaka after exposure to 17 alpha-ethinylestradiol and 17 beta-trenbolone», Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51, pp. 237-243.

(20) Scholz, S. and N. Kluver (2009), «Effects of Endocrine Disrupters on Sexual, Gonadal Development in Fish, Sexual Development» 3, pp. 136-151.

(21) Fenske, M., G. Maack, C. Schafers and H. Segner (2005), «An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, Danio rerio», Environmental Toxicology and Chemistry 24, pp. 1088-1098.

(22) OCDE (2010), *Guidance Document on the Diagnosis of Endocrine-related Histopathology in Fish Gonads*, Series on Testing and Assessment N$^{o}$ 123, ENV/JM/MONO(2010)14, OCDE, París.

(23) Kobayashi, T., M. Matsuda, H. Kajiura-Kobayashi, A. Suzuki, N. Saito, M. Nakamoto, N. Shibata, and Y. Nagahama (2004), «Two DM domain genes, DMY and DMRT1, involved in testicular differentiation and development in the medaka, Oryzias latipes», Developmental Dynamics 231, pp. 518-526.

(24) Shinomiya, A., H. Otake, K. Togashi, S. Hamaguchi, and M. Sakaizumi (2004), «Field survey of sex-reversals in the medaka, Oryzias latipes: genotypic sexing of wild populations», Zoological Science 21, pp. 613-619.

(25) Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak and R.W. Flick (2007), «Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen», Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, pp. 8897-8901.

(26) Palace,V.P., R.E. Evans, K.G. Wautier, K.H. Mills, P.J. Blanchfield, B.J. Park, C.L. Baron and K.A. Kidd (2009), «Interspecies differences in biochemical, histopathological, and population responses in four wild fish species exposed to ethynylestradiol added to a whole lake», Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 66, pp. 1920-1935.

(27) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, J. Bamforth, R.D. Stanley, S. Duffell, A. Hargreaves, S. Gimeno, and C.R. Tyler (2006), «Development of chronic tests for endocrine active chemicals — Part 1. An extended fish early-life stage test for oestrogenic active chemicals in the fathead minnow (Pimephales promelas)», Aquatic Toxicology 77, pp. 279-290.

▼**M6**

(28) Holbech, H., K. Kinnberg, G.I. Petersen, P. Jackson, K. Hylland, L. Norrgren and P. Bjerregaard (2006), «Detection of endocrine disrupters: Evaluation of a Fish Sexual Development Test (FSDT)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 144, pp. 57-66.

(29) Andersen, L., K. Kinnberg, H. Holbech, B. Korsgaard and P. Bjerregaard (2004), «Evaluation of a 40 day assay for testing endocrine disrupters: Effects of an anti-estrogen and an aromatase inhibitor on sex ratio and vitellogenin concentrations in juvenile zebrafish (Danio rerio)», Fish Physiology and Biochemistry 30, pp. 257-266.

(30) Morthorst, J.E., H. Holbech and P. Bjerregaard (2010), «Trenbolone causes irreversible masculinization of zebrafish at environmentally relevant concentrations», Aquatic Toxicology 98, pp. 336-343.

(31) Kiparissis,Y., T.L. Metcalfe, G.C. Balch and C.D. Metcalf (2003), «Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (Oryzias latipes)», Aquatic Toxicology 63, pp. 391-403.

(32) Panter, G.H., T.H. Hutchinson, K.S. Hurd, A. Sherren, R.D. Stanley and C.R. Tyler (2004), «Successful detection of (anti-) androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (Pimephales promelas) using easily measured endpoints of sexual development», Aquatic Toxicology 70, pp. 11-21.

(33) Kinnberg, K., H. Holbech, G.I. Petersen and P. Bjerregaard (2007), «Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (Danio rerio)», Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145, pp. 165-170.

(34) Capítulo C.14 del presente anexo. Ensayo de crecimiento en peces juveniles.

(35) Capítulo C.4 del presente anexo. Biodegradabilidad fácil.

(36) OCDE (2000), *Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*, Series on Testing and Assessment Nº 23, OCDE, París.

(37) OCDE (2009), *Fish Short Term Reproduction Assay,* Test Guideline Nº 229, Guidelines for the Testing of Chemicals, OCDE, París

(38) Capítulo C.37 del presente anexo. Ensayo de veintiún días en peces cribado a corto plazo de la actividad estrogénica y androgénica y de la inhibición de la aromatasa.

(39) OCDE (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Series on Testing and Assessment Nº 171, OCDE, París

(40) Schäfers, C., Teigeler, M., Wenzel, A., Maack, G., Fenske, M., Segner, H (2007), «Concentration- and time-dependent effects of the synthetic estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol, on reproductive capabilities of the zebrafish, Danio rerio», Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A, 70, 9-10 pp. 768-779.

(41) OCDE (2011), *Validation Report (Phase 1) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Nº 141, ENV/JM/MONO(2011)22, OCDE, París.

(42) OCDE (2011), *Validation Report (Phase 2) for the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Nº 142, ENV/JM/MONO(2011)23, OCDE, París.

(43) OCDE (2011), *Peer Review Report of the validation of the Fish Sexual Development Test*, Series on Testing and Assessment Nº 143, ENV/JM/MONO(2011)24, OCDE, París.

(44) Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos, DO L 276 de 20.10.2010, p. 33.

▼M6

*Apéndice 1*

**Abreviaturas y definiciones**

**Parámetro principal**: provoca un efecto a nivel de población.

**ASV**: valor de saturación de aire.

**Biomarcador**: provoca un efecto a nivel de individuo.

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**Dph**: días después de la eclosión.

**DMY**: gen del dominio DM específico de Y necesario para el desarrollo de los machos en el medaka.

**ELISA**: enzimoinmunoanálisis de adsorción.

**Peso del pez**: peso húmedo del pez (secado con material absorbente).

**FSDT**: ensayo sobre desarrollo sexual en peces.

**Eje HPG**: eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

**Pez hermafrodita**: pez con más de un ovocito en los testículos, en las seis secciones analizadas, o con células espermatogénicas en los ovarios (sí/no).

**Tasa de carga**: peso húmedo de los peces por volumen de agua.

**MDA**: mecanismo de acción.

**RT-PCR**: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Pez indiferenciado**: pez con gónadas que no presentan células germinales discernibles.

**VTG**: vitelogenina.

▼**M6**

*Apéndice 2*

**Condiciones experimentales para el FSDT (especies de agua dulce)**

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. Especies recomendadas | Medaka (*Oryzias latipes*) | Pez cebra (*Danio rerio*) | Espinoso (*Gasterosteus aculeatus*) |
| 2. Tipo de ensayo | Dinámico o semiestático | Dinámico o semiestático | Dinámico o semiestático |
| 3. Temperatura del agua | 25 ± 2 °C | 27 ± 2 °C | 20 ± 2 °C |
| 4. Calidad de la iluminación | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) |
| 5. Intensidad de la luz | 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 080 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) | 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 080 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) | 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 080 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) |
| 6. Fotoperiodo | 12-16 h de luz, 8-12 h de oscuridad | 12-16 h de luz, 8-12 h de oscuridad | 16 h de luz, 8 h de oscuridad |
| 7. Tamaño mínimo de cámara | Las cámaras individuales deben contener, como mínimo, 7 l de volumen de agua. | Las cámaras individuales deben contener, como mínimo, 7 l de volumen de agua. | Las cámaras individuales deben contener, como mínimo, 7 l de volumen de agua. |
| 8. Sustituciones de volumen de las soluciones de ensayo | 5 diarias como mínimo | 5 diarias como mínimo | 5 diarias como mínimo |
| 9. Edad de los organismos del ensayo al iniciar la exposición | Huevos recién fertilizados (fase de blástula temprana) | Huevos recién fertilizados (fase de blástula temprana) | Huevos recién fertilizados |
| 10. Nº de huevos por tratamiento | Mínimo 120 | Mínimo 120 | Mínimo 120 |
| 11. Número de tratamientos | 3 como mínimo (más los controles correspondientes) | 3 como mínimo (más los controles correspondientes) | 3 como mínimo (más los controles correspondientes) |
| 12. Nº de réplicas por tratamiento | 4 como mínimo (a menos que haya asignación de raíz cuadrada a los controles) | 4 como mínimo (a menos que haya asignación de raíz cuadrada a los controles) | 4 como mínimo (a menos que haya asignación de raíz cuadrada a los controles) |
| 13. Régimen de alimentación | Ejemplares vivos de *Artemia*, gambas artemia adultas congeladas, alimento en copos, etc. Se recomienda alimentar dos veces al día. | Alimentos fritos especiales, vivos de *Artemia*, gambas artemia adultas congeladas, alimento en copos, etc. Se recomienda alimentar dos veces al día. | Ejemplares vivos de *Artemia*, gambas artemia adultas congeladas, alimento en copos, etc. Se recomienda alimentar dos veces al día. |
| 14. Aireación | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior a una saturación del 60 %. | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior a una saturación del 60 %. | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior a una saturación del 70 %. |

▼M6

| | | | |
|---|---|---|---|
| 15. Agua de dilución | Agua limpia superficial, de pozo o reconstituida | Agua limpia superficial, de pozo o reconstituida | Agua limpia superficial, de pozo o reconstituida |
| 16. Duración de la exposición a la sustancia problema | 60 dph | 60 dph | 60 dph |
| 17. Parámetros biológicos | Éxito de la eclosión, supervivencia, morfología a nivel macroscópico, VTG, histología de las gónadas, sexo genético, proporción de sexos | Éxito de la eclosión, supervivencia, morfología a nivel macroscópico, VTG, histología de las gónadas, proporción de sexos | Éxito de la eclosión, supervivencia, morfología a nivel macroscópico, VTG, histología de las gónadas, proporción de sexos |
| 18. Criterios de aceptabilidad del ensayo para las réplicas combinadas de los controles | Éxito de la eclosión > 80 % | Éxito de la eclosión > 80 % | Supervivencia tras la eclosión ≥ 70 % |
| | Supervivencia tras la eclosión ≥ 70 % | Supervivencia tras la eclosión ≥ 70 % | Éxito de la eclosión > 80 % |
| | Crecimiento (peso húmedo de los peces, secados con material absorbente) > 150 mg | Crecimiento (peso húmedo de los peces, secados con material absorbente) > 75 mg | Crecimiento (peso húmedo de los peces, secados con material absorbente) > 120 mg |
| | Longitud (longitud estándar) > 20 mm | Longitud (longitud estándar) > 14 mm | Longitud (longitud estándar) > 20 mm |
| | Proporción de sexos (% de machos o hembras) 30-70 % | Proporción de sexos (% de machos o hembras) 30-70 % | Proporción de sexos (% de machos o hembras) 30-70 % |

▼**M6**

*Apéndice 3*

**Características químicas de un agua de dilución aceptable**

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN |
|---|---|
| Materia en partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

▼**M6**

*Apéndice 4*

**Del método de ensayo c.14/ orientaciones sobre las concentraciones de ensayo**

| Columna (número de concentraciones entre 100 y 10, o entre 10 y 1) (*) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 32 | 46 | 56 | 63 | 68 | 72 | 75 |
| 10 | 22 | 32 | 40 | 46 | 52 | 56 |
| 3,2 | 10 | 18 | 25 | 32 | 37 | 42 |
| 1,0 | 4,6 | 10 | 16 | 22 | 27 | 32 |
| | 2,2 | 5,6 | 10 | 15 | 19 | 24 |
| | 1,0 | 3,2 | 6,3 | 10 | 14 | 18 |
| | | 1,8 | 4,0 | 6,8 | 10 | 13 |
| | | 1,0 | 2,5 | 4,6 | 7,2 | 10 |
| | | | 1,6 | 3,2 | 5,2 | 7,5 |
| | | | 1,0 | 2,2 | 3,7 | 5,6 |
| | | | | 1,5 | 2,7 | 4,2 |
| | | | | 1,0 | 1,9 | 3,2 |
| | | | | | 1,4 | 2,4 |
| | | | | | 1,0 | 1,8 |
| | | | | | | 1,3 |
| | | | | | | 1,0 |

(*) Puede seleccionarse una serie de tres (o más) concentraciones sucesivas en una columna. Los puntos medios entre las concentraciones de la columna (x) se encuentran en la columna (2x + 1). Los valores de la lista pueden representar concentraciones expresadas en forma de porcentaje por volumen o peso (mg/l o µg/l). Los valores pueden multiplicarse o dividirse por la potencia de 10 adecuada. Puede emplearse la primera columna si el grado de toxicidad es muy incierto.

▼M6

*Apéndice 5*

**Orientaciones para la homogeneización de la cabeza y la cola de los ejemplares juveniles de pez cebra, pez cabeza gorda, espinoso y medaka**

La finalidad de esta sección es describir los procedimientos que tienen lugar antes de la cuantificación de la concentración de VTG. Se pueden utilizar otros procedimientos que den como resultado una cuantificación comparable de la VTG. Es opcional determinar la concentración de VTG en el plasma sanguíneo o el hígado, en lugar del homogeneizado de cabeza/cola.

**Procedimiento**

1. Los peces son anestesiados y sacrificados de conformidad con la descripción del ensayo.

2. Se cortan la cabeza y la cola para separarlas del pez de acuerdo con la descripción del ensayo. **Importante**: Todos los instrumentos de disección y la tabla de corte deben enjuagarse y limpiarse a fondo (por ejemplo, con etanol al 96 %) entre cada uno de los peces para evitar que haya «contaminación de la VTG» de las hembras o de los machos inducidos a los machos no inducidos.

3. El peso de la cabeza y la cola juntas de cada pez se mide con precisión de un mg.

4. Tras el pesaje, las partes se colocan en los tubos correspondientes (por ejemplo, Eppendorf de 1,5 ml) y se congelan a – 80 °C hasta que se produzca la homogeneización o se homogeneizan directamente en hielo con dos manos de mortero de plástico. (Se pueden utilizar otros métodos si estos se llevan a cabo con hielo y el resultado es una masa homogénea.) **Importante**: *Los tubos deben numerarse correctamente de modo que la cabeza y la cola de los peces puedan correlacionarse con la parte correspondiente del cuerpo que se haya utilizado para la histología gonadal.*

5. Cuando se logra una masa homogénea, se añade una cantidad de cuatro a diez veces el peso del tejido del **tampón de homogenización** (*) enfriado con hielo (se debe indicar la dilución). Siga trabajando con el mortero hasta que la mezcla sea homogénea. **Nota importante**: *Se utilizan morteros nuevos para cada pez*.

6. Las muestras se colocan en hielo hasta que se realiza la centrifugación a **4 °C** a 50 000 g durante 30 min.

7. Utilice una pipeta para colocar porciones de 20 a 50 µl de sobrenadante (indique la cantidad) en **dos tubos como mínimo**, sumergiendo el extremo de la pipeta por debajo de la capa de grasa de la superficie y, con cuidado, succionando el sobrenadante sin fracciones de grasa ni de precipitado.

8. Los tubos se conservan a – 80 °C hasta que se utilicen.

(*) *Tampón de homogeneización:*

Tris-HCl 50 mM con pH 7,4; mezcla inhibidora de la proteasa al 1 % (Sigma): 12 ml de Tris-HCl con pH 7,4 + 120 µl de mezcla inhibidora de la proteasa (o mezclas de inhibidores de la proteasa equivalentes).

TRIS: TRIS ULTRAPURO (ICN)

Mezcla inhibidora de la proteasa: de Sigma (para tejidos de mamíferos), número de referencia **P 8340**.

***Nota:*** El tampón de homogeneización debe utilizarse el mismo día que se elabore. Colóquelo en hielo durante su uso.

▼M6

*Apéndice 6*

**Orientaciones para la cuantificación de la vitelogenina del homogeneizado de cabeza y cola en el pez cebra (*Danio rerio*) (modificado de holbech *et al.*, 2001). se pueden utilizar otros procedimientos con anticuerpos y patrones homólogos.**

1. Las placas de microtitulación (certificadas Maxisorp F96, Nunc, Roskilde, Dinamarca) recubiertas previamente con IgG antilipovitelina de pez cebra de 5 µg/ml se descongelan y se lavan tres veces con tampón de lavado (*).

2. El patrón de vitelogenina purificada de pez cebra ([1]) se diluye en serie hasta las concentraciones de 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 y 20 ng/ml en tampón de dilución (**) y las muestras se diluyen, como mínimo, 200 veces (para evitar el efecto de matriz) en el tampón de dilución y se aplican a las placas. Se aplica un control del ensayo por duplicado. Se aplican 150 µl a cada pocillo. Los patrones se aplican por duplicado y las muestras, por triplicado. Se incuban hasta el día siguiente a 4 °C en un agitador.

3. Las placas se lavan cinco veces con tampón de lavado (*).

4. El HRP acoplado a una cadena de dextrano (por ejemplo, AMDEX A/S, Dinamarca) y los anticuerpos conjugados se diluyen en tampón de lavado; la dilución concreta varía por lote y antigüedad. Se aplican 150 µl a cada pocillo y las placas se incuban durante una hora a temperatura ambiente en un agitador.

5. Las placas se lavan cinco veces con tampón de lavado (*) y el fondo de las placas se limpia bien con etanol.

6. Se aplican 150 µl de TMB plus (***) a cada pocillo. La placa se debe proteger de la luz con papel de aluminio y hay que observar el desarrollo del color en un agitador.

7. Cuando la curva de calibración se haya desarrollado completamente, la actividad enzimática se detiene añadiendo 150 µl de 0,2 M $H_2SO_4$ a cada pocillo.

8. La absorbancia se mide a 450 nm (por ejemplo, en un lector de placas Molecular Devices Thermomax). Los datos se analizan con los programas informáticos correspondientes (por ejemplo, Softmax).

(*) Tampón de lavado:

| | | |
|---|---|---|
| Solución madre de PBS (****) | 500,0 | ml |
| BSA | 5,0 | g |
| Tween 20 | 5,0 | ml |

*Ajuste el pH a 7,3 y envase a 5 l con $H_2O$ filtrada por filtro miliporo. Conserve a 4 °C.*

(**) Tampón de dilución:

| | | |
|---|---|---|
| Solución madre de PBS (****) | 100,0 | ml |
| BSA | 3,0 | g |
| Tween 20 | 1,0 | ml |

*Ajuste el pH a 7,3 y envase a 1 l con $H_2O$ filtrada por filtro miliporo. Conserve a 4 °C.*

(***) TMB plus es un sustrato «listo para usar» producido por KemEnTec (Dinamarca). Es sensible a la luz. Conserve a 4 °C.

([1]) Battelle AP4.6.04 [1,18 mg/ml (AAA)], purificado de conformidad con: Denslow, N.D., Chow, M.C., Kroll, K.J., Green, L. (1999). Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. Ecotoxicology 8: pp. 385-398.

▼**M6**

(****) Solución madre de PBS

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 160,0 | g |
| $KH_2PO_4$ | 4,0 | g |
| $Na_2HPO_4$ $2H_2O$ | 26,6 | g |
| KCl | 4,0 | g |

*Ajuste el pH a 6,8 y enrase a 2 l con agua filtrada por filtro miliporo. Conserve a temperatura ambiente.*

▼M6

*Apéndice 7*

**Orientaciones para la preparación de las secciones de tejido destinados a la determinación del sexo y las fases de las gónadas**

La finalidad de esta sección es describir los procedimientos que tienen lugar antes de la evaluación de las secciones histológicas. Se pueden utilizar otros procedimientos que den como resultado una determinación similar del sexo y de las fases de las gónadas.

Con algunas excepciones, estos procedimientos son similares para el medaka (JMD) y el pez cebra (ZF).

**Sacrificio, autopsia y fijación de tejidos**

*Objetivos:*

1. Organizar el sacrificio compasivo de los peces.

2. Obtener los pesos corporales y las mediciones necesarios.

3. Evaluar los caracteres sexuales secundarios.

4. Diseccionar tejidos para analizar la VTG.

5. Fijación de las gónadas.

*Procedimientos:*

1. Los peces deben ser sacrificados inmediatamente antes de la autopsia. Por lo tanto, a menos que haya varios disectores disponibles, no se deben sacrificar varios peces al mismo tiempo.

2. Con la pequeña red de inmersión, se extrae un pez de la cámara experimental y se traslada a la zona de autopsia en el contenedor de transporte.

3. El pez se coloca en la solución de sacrificio indoloro. El pez se retira de la solución cuando deja de respirar y no responde a estímulos externos.

4. Se obtiene el peso húmedo del pez.

5. Para preparar los tejidos destinados al análisis de la VTG, los peces se pueden colocar sobre un corcho en la platina de un microscopio de disección.

   a. En el caso del pez cebra, se corta la cabeza justo detrás de la aleta pectoral, y la cola se corta justo detrás de la aleta dorsal.

   b. En el caso del medaka, el abdomen se abre con una incisión realizada con mucho cuidado, que se extiende a lo largo de la línea media ventral, desde la cintura escapular hasta un punto anterior al ano. Con las pinzas pequeñas y las tijeras pequeñas, se extirpa el hígado con cuidado.

6. Las muestras para el análisis de la VTG se colocan en tubos Eppendorf y se congelan de inmediato en nitrógeno líquido.

7. El cadáver, incluyendo las gónadas, se coloca en un casete de plástico para tejidos previamente etiquetado, que se traslada a fijador de Davidson o de Bouin. El volumen de fijador debe ser, como mínimo, de diez veces el volumen aproximado de los tejidos. El recipiente de fijador se agita suavemente durante cinco segundos para eliminar las burbujas de aire del casete.

8. a. Todos los tejidos se mantienen en fijador de Davidson durante una noche y, al día siguiente, se trasladan a recipientes individuales de formol tamponado neutro al 10 %. Los recipientes con casetes se agitan suavemente durante cinco segundos para garantizar la penetración adecuada del formol en los casetes.

▼M6

b. Los tejidos permanecen en fijador de Bouin durante 24 horas y, posteriormente, se trasladan a etanol al 70 %.

**Procesamiento de los tejidos**

*Objetivos:*

1. Deshidratar el tejido para que la parafina penetre adecuadamente.

2. Impregnar el tejido con parafina para mantener su integridad y crear una superficie firme para la microtomía.

*Procedimientos:*

3. Los casetes de tejido etiquetados se retiran de la conservación en formol o etanol y se colocan en las cestas de procesamiento. La cesta de procesamiento se carga en el procesador de tejidos.

4. Se selecciona el programa de procesamiento.

5. Una vez que el procesador de tejidos finaliza el ciclo de procesamiento, las cestas pueden transferirse al puesto de inclusión.

**Inclusión**

*Objetivo:*

Orientar correctamente la muestra en parafina solidificada para microtomía.

*Procedimientos:*

1. Las cestas de casetes se retiran del procesador y se sumergen en la cámara delantera llena de parafina de la consola térmica del puesto de inclusión, o bien se llevan los casetes a un calentador de parafina separado.

2. El primer casete que se vaya a incluir se retira de la cámara delantera de la consola térmica o del calentador de parafina. Se retira la tapa del casete y se elimina, y la etiqueta del casete se verifica con los registros del animal para resolver las posibles discrepancias antes de la inclusión.

3. Se selecciona un molde de inclusión de un tamaño adecuado.

4. El molde se coloca debajo de la boquilla de la consola de dispensación y se llena de parafina fundida.

5. La muestra se retira del casete y se coloca en la parafina fundida en el molde. Este proceso debe repetirse con 4 a 8 muestras por molde de parafina. La posición de cada pez se marca colocando el pez nº 1 a 180 grados de los peces 2-4/8.

6. Se añade más parafina para cubrir la muestra.

7. El molde con la base del casete se coloca en la placa de refrigeración de la consola criogénica.

8. Una vez que la parafina se haya solidificado, el bloque (es decir, la parafina endurecida que contiene los tejidos y la base del casete) se retira del molde.

**Microtomía**

*Objetivo:*

Cortar y montar las secciones histológicas para la tinción.

*Procedimientos:*

1. La fase inicial de la microtomía, denominada «recorte», se realiza de la forma siguiente:

   a. El bloque de parafina se coloca en el mandril del micrótomo.

   b. El mandril se hace avanzar girando la rueda del micrótomo y se cortan secciones gruesas de la superficie de parafina del bloque hasta que la cuchilla llega a los tejidos incluidos.

▼M6

c. El grosor de sección del micrótomo se ajusta entre 3 y 5 micras. El mandril se hace avanzar y se cortan varias secciones del bloque para eliminar cualquier artefacto creado en la superficie de corte del tejido al realizar el recorte basto.

d. El bloque se puede retirar del mandril y colocarse boca abajo, sobre hielo, para empapar el tejido.

2. La fase siguiente de la microtomía consiste en el corte final y el montaje de las secciones de tejido en portaobjetos. Estos procedimientos se realizan de la forma siguiente:

a. Si el bloque se ha colocado en hielo, se retira del hielo y se vuelve a colocar en el mandril del micrótomo.

b. Con el grosor de sección del micrótomo ajustado a 3-5 micras, se hace avanzar el mandril girando la rueda del micrótomo. Se cortan secciones del bloque hasta que se crea una «cinta» que contenga al menos una sección aceptable, incluyendo las gónadas. (Según resulte necesario durante la división, el bloque puede retirarse del mandril, colocarse en hielo para empapar el tejido y volver a colocarse en el mandril.)

c. Las secciones flotan planas sobre la superficie del agua, en el baño de agua. Se intenta obtener al menos una sección que no tenga arrugas ni burbujas de aire atrapadas debajo.

d. Se sumerge un portaobjetos del microscopio debajo de la mejor sección, que se levanta y se saca del agua mediante el portaobjetos. Este proceso se denomina «montaje» de la sección en el portaobjetos.

e. Se preparan tres secciones para un conjunto de peces. La segunda y la tercera secciones se toman a intervalos de 50 micras después de la primera sección. Si los peces no se han incluido con las gónadas en el mismo nivel de sección, se realizan más secciones para asegurarse de que se obtengan de cada pez al menos seis secciones que incluyan las gónadas.

f. Con un rotulador para portaobjetos, se registra en el portaobjetos el número de bloque del que se ha producido el portaobjetos.

g. El portaobjetos se coloca en una bandeja de tinción.

h. El bloque se retira del mandril y se coloca boca abajo para guardarlo.

**Tinción, colocación del cubreobjetos y etiquetado del portaobjetos**

*Objetivos:*

— Teñir las secciones para realizar el examen histopatológico.

— Sellar permanentemente los tejidos montados y teñidos.

— Identificar permanentemente las secciones teñidas de forma que se permita una trazabilidad completa.

*Procedimientos:*

1. Tinción

a. Los portaobjetos se secan al aire durante la noche antes de teñirlos.

b. Las secciones se tiñen con hematoxilina-eosina.

2. Colocación del cubreobjetos

a. Los cubreobjetos se pueden colocar manual o automáticamente.

b. Se sumerge un portaobjetos en xileno o TissueClear, y el exceso de xileno o TissueClear se retira del portaobjetos golpeando con cuidado.

▼**M6**

c. Se aplica aproximadamente 0,1 ml de medio de montaje cerca del extremo del portaobjetos opuesto al extremo esmerilado, o en el cubreobjetos.

d. El cubreobjetos se inclina formando un ángulo poco pronunciado cuando se coloca en el portaobjetos.

3. Etiquetado

e. Cada etiqueta de portaobjetos debe contener los datos siguientes.

i. Nombre del laboratorio

ii. Especie

iii. Nº de muestra / nº de portaobjetos

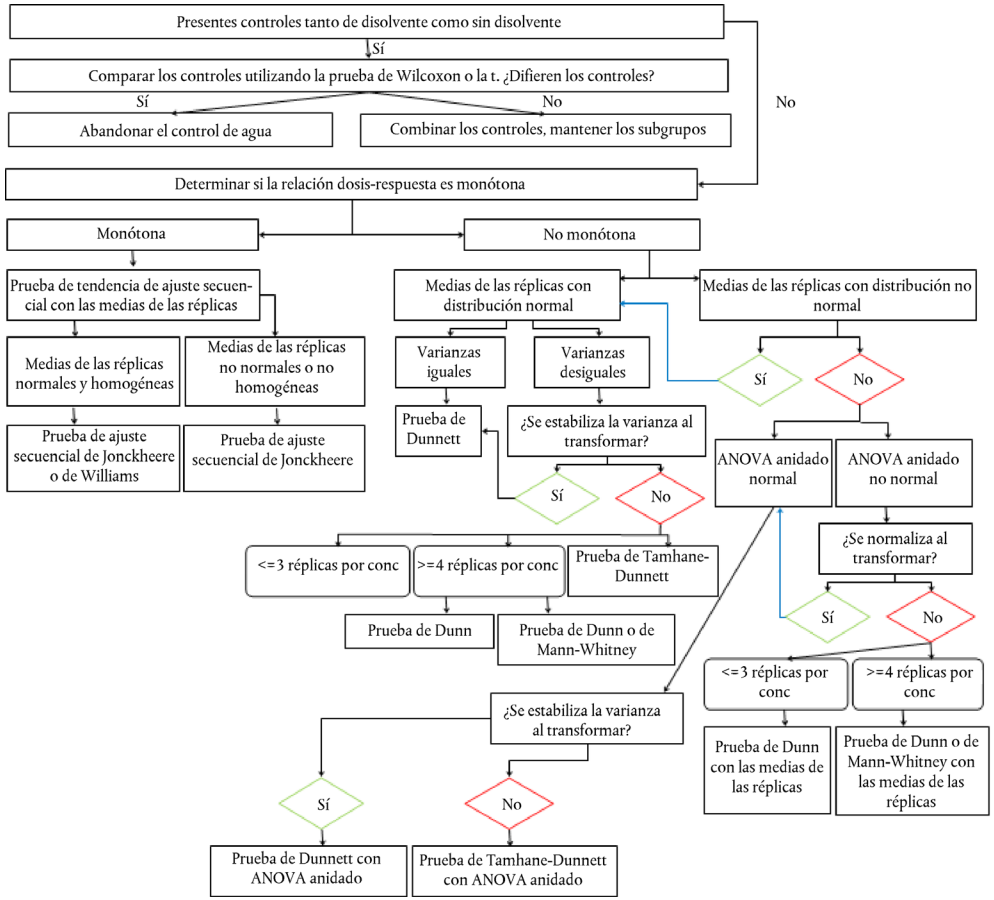
iv. Sustancia / grupo de tratamiento

v. Fecha

▼M6

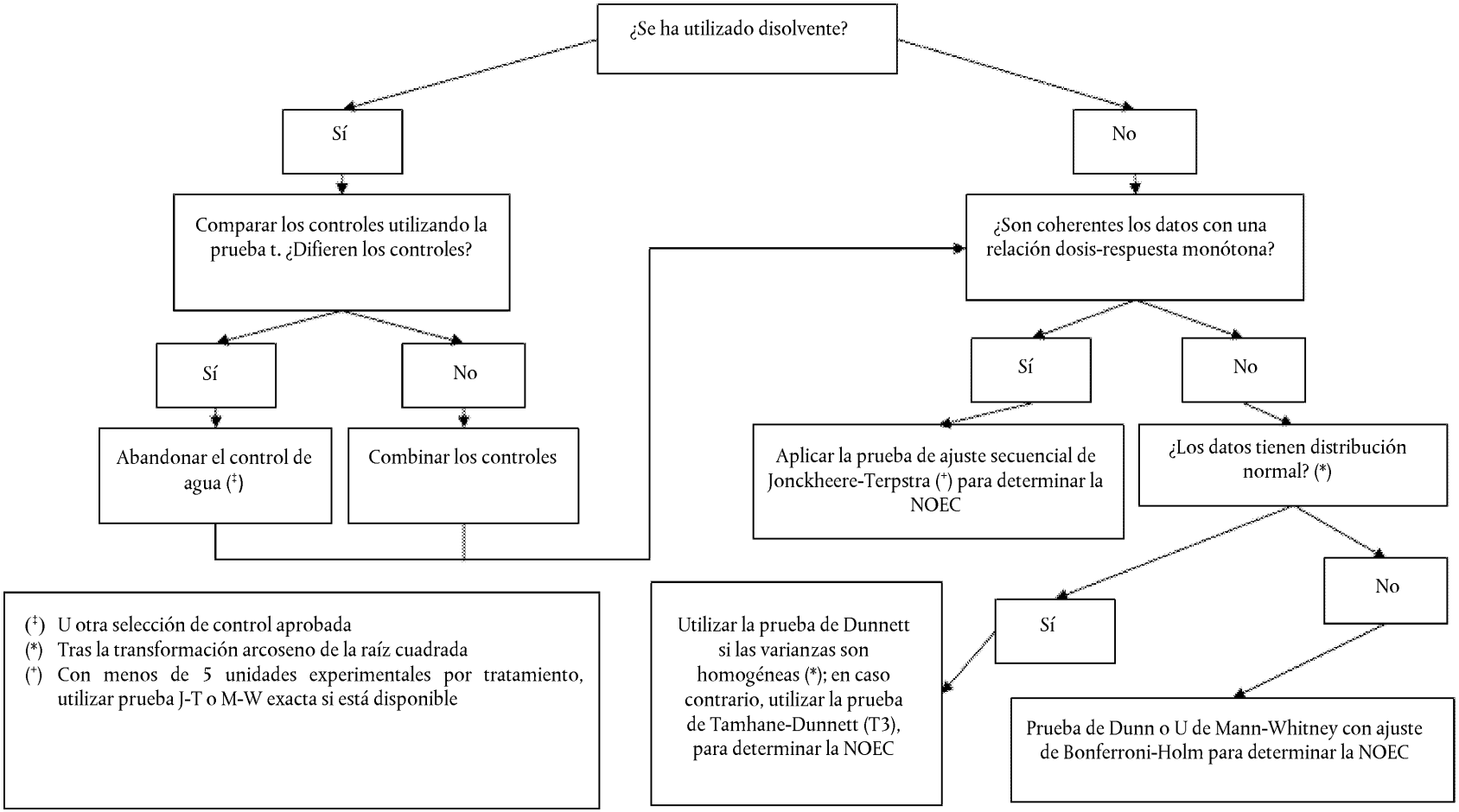
*Apéndice 8*

**Diagrama de flujo estadístico para el análisis de la vitelogenina**



▼M6

**Diagrama de flujo estadístico para el análisis de las proporciones de sexo**



▼M6

*Apéndice 9*

**Orientaciones para el muestreo de tejidos a fin de determinar el sexo genético y de determinar el sexo genético mediante el método de PCR**

**Muestreo, preparación y conservación de tejidos antes de determinar el sexo genético mediante el método de PCR en el medaka (elaborado por el Laboratorio de Organismos Acuáticos de Bayer CropScience AG)**

1. Con unas tijeras finas se corta la aleta anal o dorsal de cada pez y se coloca en un tubo lleno de 100 µl de tampón de extracción 1 (se puede consultar más información sobre la preparación del tampón más adelante). Las tijeras deben limpiarse después de su uso con cada pez en un vaso lleno de $H_2O$ destilada y deben secarse con una servilleta de papel.

2. A continuación, los tejidos de la aleta se homogeneizan con una mano de mortero de teflón de microtubo para llevar a cabo la lisis de las células. Con cada tubo se utilizará una nuevoa mano de mortero para evitar contaminaciones. Las manos de mortero se dejan por la noche en NaOH 0,5 M, se enjuagan durante cinco minutos en $H_2O$ destilada y se guardan en etanol o en medio estéril después de pasarlos por autoclave hasta que se vayan a utilizar.

3. También se puede conservar el tejido de aleta sin tampón de extracción 1 en hielo seco y, después, en un frigorífico a – 80 °C, para evitar que degenere el ADN. Pero la extracción funciona mejor si se extrae el ADN al mismo tiempo (véase la manipulación más arriba; las muestras deben descongelarse en hielo tras conservarlas a – 80 °C, antes de que los tubos se llenen de tampón).

4. Tras la homogeneización, todos los tubos se colocan en un baño de agua y se llevan a ebullición durante 15 minutos a 100 °C.

5. A continuación, se pipetean 100 µl del tampón de extracción 2 a cada tubo (se puede consultar más información sobre la preparación del tampón más adelante). Las muestras se conservan a temperatura ambiente durante 15 minutos y, mientras tanto, se agitan ocasionalmente, con suavidad, con la mano.

6. Posteriormente, todos los tubos se vuelven a colocar en el baño de agua y se llevan a ebullición durante 15 minutos más a 100 °C.

7. Hasta que se realicen los análisis, los tubos se congelan a – 20 °C.

**Preparación de los tampones**

Tampón de PCR 1:

500 mg de N-lauroilsarcosina (por ejemplo, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania)

2 ml de NaCl 5 M

Añadir 100 ml de $H_2O$ destilada

→ autoclave

Tampón de PCR 2:

20 g de Chelex (por ejemplo, Biorad, Múnich, Alemania)

Hinchar en 100 ml de $H_2O$ destilada

→ autoclave

**Determinación del sexo genético (mediante el método de PCR) en el medaka (elaborado por el Laboratorio de Organismos Acuáticos de Bayer CropScience AG y el Biozentrum de la Universidad de Wurzburgo)**

Los tubos preparados y congelados (descritos en el apartado anterior) se descongelan en hielo. A continuación, se centrifugan con una centrífuga Eppendorf (30 seg a la velocidad máxima, a temperatura ambiente). Para la de PCR se utiliza el sobrenadante transparente separado del precipitado. Hay que evitar obligatoriamente que se transfieran restos de Chelex (localizado en el precipitado) a la reacción PCR, porque esto interferiría con la actividad de la polimerasa «Taq». El sobrenadante se utiliza directamente o se puede conservar congelado (a – 20 °C) y volver a descongelarlo en varios ciclos sin afectar negativamente al ADN a la hora de realizar análisis posteriores.

▼**M6**

1. *Preparación de la «mezcla de reacción» (25 µl por muestra)*

| | Volumen | Concentración final |
|---|---|---|
| Cadena molde de ADN | De 0,5 a 2 µl | |
| Tampón 10x para PCR con $MgCl_2$ | 2,5 µl | 1x |
| Nucleótidos (de dATP, dCTP, dGTP y dTTP) | 4 µl (5 mM) | 200 µM |
| Cebador directo (10 µM) (véase el punto 3-5 más adelante) | 0,5 µl | 200 nM |
| Cebador inverso (10 µM) (véase el punto 3-5 más adelante) | 0,5 µl | 200 nM |
| DMSO | 1,25 µl | 5 % |
| Agua (apta para PCR) | Hasta 25 µl | |
| Polimerasa-E Taq | 0,3 µl | 1,5 U |
| Tampón 10x para PCR con $MgCl_2$: Tris/HCl 670 mM (pH 8,8 a 25 °C), $(NH_4)_2SO_4$ 160 mM, $MgCl_2$ 25 mM, Tween 20 al 0,1 % | | |

Para cada PCR (véase el punto 3-5 más adelante), se requiere el cebador especial como nueva combinación de «mezcla de reacción» y de la cantidad necesaria y adecuada de molde de ADN para cada muestra (véase más arriba). Los volúmenes correspondientes se transferirán a nuevos tubos mediante pipetas. A continuación, todos los tubos se cierran, se agitan (aproximadamente durante 10 segundos) y se centrifugan (10 segundos a temperatura ambiente). Después pueden comenzar los respectivos programas de PCR. También se utilizarán un control positivo (muestra de ADN de ejemplo con actividad conocida y resultados claros) y un control negativo (1 µl de $H_2O$ destilada) en cada programa de PCR.

2. *Preparación del gel de agarosa (1 %) — Durante la ejecución de los programas de PCR:*

— Disuelva 3 g de agarosa en 300 ml de tampón TAE 1 × (gel de agarosa al 1 %).

— Esta solución debe llevarse a ebullición con un microondas (2-3 min aproximadamente).

— Transfiera la solución caliente a una caja de moldeado especial, colocada sobre hielo.

— Cuando hayan transcurrido unos 20 minutos, el gel de agarosa estará listo para usarlo.

— Conserve el gel de agarosa en tampón TAE 1 × hasta que finalicen los programas de PCR.

3. *Programa de PCR-actina:*

La finalidad de esta reacción PCR es demostrar que el ADN de la muestra no ha sufrido daños.

— Cebador especial:

«Mact1 (superior/directo)» → TTC AAC AGC CCT GCC ATG TA

«Mact2 (inferior/inverso)» → GCA GCT CAT AGC TCT TCT CCA GGG AG

— Programa:

5 min a 95 °C

Ciclo (35 veces):

Desnaturalización → 45 seg a 95 °C

Hibridación → 45 seg a 56 °C

Alargamiento → 1 min a 68 °C

15 min a 68 °C

▼M6

4. *Programa de PCR de genes X e Y:*

Las muestras con ADN intacto se utilizarán en este programa de PCR para detectar los genes X e Y. El ADN masculino debería presentar una doble banda y el ADN femenino debería presentar una única banda (después de la tinción y la electroforesis en gel). En esta serie del programa se deben incluir un control positivo para los machos (muestra XY) y uno para las hembras (muestra XX).

— Cebador especial:

«PG 17,5» (superior/directo) → CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG

«PG 17,6» (inferior/inverso) → GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA

— Programa:

5 min a 95 °C

Ciclo (40 veces):

| | |
|---|---|
| Desnaturalización | → 45 seg a 95 °C |
| Hibridación | → 45 seg a 55 °C |
| Alargamiento | → 1 min 30 seg a 68 °C |

15 min a 68 °C

5. *Programa de PCR del gen Y como «control» para el programa de PCR de genes X e Y:*

Este programa de PCR verifica los resultados del «programa de PCR de genes X e Y». Las «muestras de machos» deberían presentar una única banda y las «muestras de hembras» no deberían presentar ninguna banda (después de la tinción y la electroforesis en gel).

— Cebador especial:

«DMTYa (superior/directo)» → GGC CGG GTC CCC GGG TG

«DMTYd (inferior/inverso)» → TTT GGG TGA ACT CAC ATG G

— Programa:

5 min a 95 °C

Ciclo (40 veces):

| | |
|---|---|
| Desnaturalización | → 45 seg a 95 °C |
| Hibridación | → 45 seg a 56 °C |
| Alargamiento | → 1 min a 68 °C |

15 min a 68 °C

6. *Tinción de las muestras de PCR:*

Solución de tinción:

Glicerol al 50 %

EDTA 100 mM

SDS al 1 %

Azul de bromofenol al 0,25 %

Xilencianol al 0,25 %

Pipetee 1 µl de la solución de tinción en cada tubo.

7. *Inicio de la electroforesis en gel:*

— El gel de agarosa al 1 % preparado se transfiere a una cámara de electroforesis en gel llena de tampón TAE 1x.

— Se pipetean de 10 a 15 µl de cada muestra de PCR teñida en una ranura del gel de agarosa.

— Asimismo, se pipetean de 5 a 15 µl de la «escala» 1 kb (Invitrogen) en otra ranura.

— Inicie la electroforesis a 200 V.

— Pare una vez transcurridos de 30 a 45 minutos.

▼**M6**

8. *Determinación de las bandas:*

— Limpie el gel de agarosa con $H_2O$ destilada.

— A continuación, transfiera el gel de agarosa a bromuro de etidio durante un periodo de 15 a 30 minutos.

— Luego se debe captar una imagen del gel de agarosa con una caja de rayos UV.

— Por último, las muestras se analizan comparándolas con la banda (o bandas) de control positivo y la escala.

▼M6

*Apéndice 10*

**Orientación sobre el muestreo de tejido para determinar el sexo genético con el método de PCR en el espinoso**

**Muestreo de tejidos y extracción de ADN**

El ADN puede extraerse con diversos reactivos disponibles en el mercado y con sistemas de extracción tanto manuales como automáticos. A continuación se describe el protocolo utilizado en el laboratorio Cefas de Weymouth y, cuando procede, se han añadido planteamientos alternativos.

1. Con unas tijeras finas se corta un trocito de tejido (10-20 mg) del área dorsolateral (tras retirar la cabeza y la cola para el análisis de VTG) de cada pez. El tejido se introduce en un tubo, que se coloca directamente en nitrógeno líquido (para conservarlo a – 80 °C) o se llena con etanol al 70 % (para su transporte y posterior almacenamiento a 4 °C). Las tijeras se limpian después de cada pez con etanol al 70 % y, a continuación, con agua destilada, y se secan con una servilleta de papel.

2. El etanol (si lo hubiera) se elimina por aspiración y el tejido se macera durante la noche con proteinasa K en 400 µl de tampón ATL (Qiagen). Una parte alícuota (200 µl) del macerado se transfiere a un bloque S de 96 pocillos (Qiagen) y el ADN se extrae en formato de 96 pocillos mediante el Qiagen Universal BioRobot y el kit QIamp Investigator BioRobot. El ADN se eluye en 50 µl de agua libre de desoxirribonucleasa y de ribonucleasa. Si se utilizan tejidos duros para extraer el ADN (como una espina o una aleta pectoral), es posible que haya que homogeneizar la muestra en el tampón de lisis con un instrumento para lisis de tejidos FastPrep® o un sistema de alteración de tejidos equivalente.

   O bien:

   a) El tejido se macera durante la noche con proteinasa K en 400 µl de tampón de lisis G2 (Qiagen) y se extrae el ADN de 200 µl del macerado con el kit EZ-1 DNA easy tissue y el biorrobot EZ-1, o con el mini kit DNA easy tissue. El ADN se eluye en un volumen de 50 µl.

   b) Los tejidos se procesan con el reactivo DNAzol. En resumen, las muestras de tejido se lisan en 1 ml de DNAzol durante 10 minutos en un microtubo de centrífuga de 1,5 ml y, a continuación, se centrifugan a 13 000 rpm durante 5 minutos para eliminar todas las partículas. A continuación, la muestra lisada se transfiere a un nuevo microtubo de centrífuga de 1,5 ml que contiene 500 µl de etanol de grado molecular al 100 %, y luego se centrifuga a 13 000 rpm durante 10 minutos para precipitar el ADN. El etanol se elimina y se sustituye por 400 µl de etanol de grado molecular al 70 %, se centrifuga a 13 000 rpm durante 5 minutos y el precipitado de ADN se disuelve en 50 µl de agua libre de desoxirribonucleasa y de ribonucleasa. De nuevo, cuando se utilicen los tejidos duros (aleta pectoral), es posible que haya que homogeneizar la muestra en el tampón de lisis con un instrumento para lisis de tejidos FastPrep® o un sistema de alteración de tejidos equivalente antes de extraer el ADN.

3. El ADN se conserva a – 20 °C hasta que sea necesario.

*Nota importante:* se deben usar guantes durante los procedimientos.

**Análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se han realizado amplificaciones con 2,5 µl del ADN extraído en un volumen de reacción de 50 µl, utilizando los cebadores de locus de isocitrato deshidrogenasa (de acuerdo con la descripción de Peichel et al., 2004. Current Biology 1:1416-1424):

| | |
|---|---|
| Cebador directo | 5' GGG ACG AGC AAG ATT TAT TGG 3' |
| Cebador inverso | 5' TAT AGT TAG CCA GGA GAT GG 3' |

▼**M6**

Hay muchos proveedores de reactivos para PCR adecuados. El método descrito a continuación es el que se utiliza actualmente en el laboratorio Cefas de Weymouth.

1. *Preparación de la «mezcla de reacción» (50 µl por muestra)*

La mezcla maestra se prepara de la siguiente manera. Se puede preparar por adelantado y conservar congelada a – 20 °C hasta que se necesite. Se debe elaborar suficiente mezcla maestra para un control negativo (solo agua de calidad de biología molecular).

| | Volumen (concentración madre)/muestra | Concentración final |
|---|---|---|
| Tampón de reacción 5x GoTaq® | 10 µl | 1x |
| $MgCl_2$ | 5 µl (25 mM) | 2,5 mM |
| Nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | 0,5 µl (25 mM cada uno) | 250 µM cada uno |
| Cebador directo | 0,5 µl (0,1 nmol/µl) | 2,0 µM |
| Cebador inverso | 0,5 µl (0,1 nmol/µl) | 2,0 µM |
| Agua de calidad de biología molecular | 30,75 µl | |
| Polimerasa GoTaq | 0,25 µl | 1,25 U |

— Ponga 47,5 µl en un tubo para PCR de pared fina de 0,5 ml etiquetado.

— Añada 2,5 µl del ADN depurado al tubo etiquetado correctamente. Repita con todas las muestras y el control negativo.

— Cubra con dos gotas de aceite mineral. También se puede utilizar un termociclador con tapa calentada.

— Cierre las tapas.

— Las muestras se desnaturalizan en un termociclador Peltier PTC-225 a 94 ± 2 °C durante 5 minutos y, a continuación, se efectúan 39 ciclos a 94 ± 2 °C durante 1 minuto; a 55 ± 2 °C durante 1 minuto; a 72 ± 2 °C durante 1 minuto; y una extensión final a 72 ± 2 °C durante 10 minutos.

2. *Preparación del gel de agarosa (2 %):*

Tradicionalmente, los productos para PCR se resuelven en un gel de agarosa al 20 % que contenga bromuro de etidio.

También se pueden utilizar sistemas de electroforesis basados en capilares.

— Pese 2 g de agarosa en 100 ml de tampón TAE 1x.

— Caliente en un microondas (aproximadamente, 2-3 min) para disolver la agarosa.

— Añada 2 gotas de concentración final de bromuro de etidio de 0,5 µg/ml.

— Transfiera la solución caliente al equipo de moldeado de gel.

— Deje que el gel se endurezca.

3. *Electroforesis en gel:*

— Transfiera el gel de agarosa al equipo de electroforesis y sumérjalo en un tampón TAE 1x.

— Cargue 20 µl de cada muestra a un pocillo distinto, añadiendo un marcador de peso molecular (escala de 100 bp de ADN, Promega) a un pocillo vacío.

— La electroforesis se realiza a 120 V durante un periodo de 30 a 45 minutos.

▼**M6**

4. *Visualización de los productos de amplificación*

Si el bromuro de etidio se ha incorporado al gel de agarosa de acuerdo con la descripción anterior, los productos de ADN se visualizan debajo de una fuente de rayos UV. El gel de agarosa también se puede teñir cubriendo el gel en una solución diluida de bromuro de etidio (0,5 μg/ml en agua) durante 30 minutos antes de la visualización.

▼M6

*Apéndice 11*

**Orientación sobre el procedimiento de fertilización artificial del espinoso**

La finalidad de esta sección es describir los procedimientos para obtener huevos fertilizados de espinoso con vistas a utilizarlos en el FSDT.

**Procedimientos**

*Obtención de esperma de los machos*

1. Se sacrifica un macho de coloración marcada de la población deseada.

2. Se diseccionan los testículos de cada lado del pez. *Los testículos, en general, son estructuras muy pigmentadas, en forma de vara, que se ven fácilmente en la línea media lateral del cuerpo*. Utilice uno de los métodos siguientes:

3. Con un par de tijeras finas, empiece por la cloaca y realice una incisión de 1 a 1,5 cm con un solo corte y una inclinación de unos 45 grados.

4. Utilice un bisturí para realizar una pequeña incisión en el lateral del pez ligeramente posterior a la pelvis y justo debajo de las placas laterales.

5. Los testículos se extirpan con unas pinzas finas y se colocan en una placa de Petri.

6. Cada testículo se cubre con 100 µl de **solución final de Hank** ([1]) recién preparada.

7. Los testículos se cortan en dados pequeños con una hoja de cuchilla o un bisturí. De esta forma se libera el esperma y se da a la solución de Hank un aspecto lechoso.

8. El fluido que contiene el esperma se añade a un tubo con cuidado de no introducir ningún trozo de tejido de los testículos al pipetear.

9. Se añaden al tubo 800 µl de solución final de Hank y se mezclan bien.

10. En caso necesario, el macho se puede conservar fijándolo con etanol al 100 % u otro fijador que se desee. Esto resulta especialmente importante si el estudio va a asignar el origen parental de los descendientes.

**Nota importante**: *Aunque la mayor parte de las soluciones madre necesarias pueden prepararse por adelantado*, ***la solución madre 5*** *y, posteriormente, la* ***solución final***, *deben utilizarse* ***frescas*** *y prepararse el mismo día en que se vayan a utilizar*.

| | |
|---|---|
| **Solución madre 1** | |
| NaCl | 8,00 g |
| KCl | 0,40 g |
| Agua destilada (DW) | 100 ml |
| **Solución madre 2** | |
| $Na_2HPO_4$ (anhidro) | 0,358 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,60 g |
| DW | 100 ml |
| **Solución madre 3** | |
| $CaCl_2$ | 0,72 g |
| DW | 50 ml |

([1]) Solución salina tamponada de Hank (HBSS):

La HBSS se necesita para conservar el esperma mientras se prepara la fertilización.

▼M6

**Solución madre 4**

| | |
|---|---|
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 1,23 g |
| DW | 50 ml |

**Solución madre 5 (recién preparada)**

| | |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 0,35 g |
| DW | 10 ml |

*Nota:* Si ya tiene alguna de las sales anteriormente mencionadas, pero con un contenido en agua distinto (es decir, $2H_2O$ en lugar de anhidro), puede utilizarlas, pero primero debe ajustar el peso con arreglo al peso molecular.

En lo que respecta a la solución final de Hank, combine en el orden siguiente:

| | |
|---|---|
| Solución madre 1 | 1,0 ml |
| Solución madre 2 | 0,1 ml |
| Solución madre 3 | 0,1 ml |
| DW | 8,6 ml |
| Solución madre 4 | 0,1 ml |
| Solución madre 5 | 0,1 ml |

Mezcle bien antes de usar.

**Fertilización**

1. Se identifican hembras grandes y grávidas entre la población deseada; las hembras estarán listas para presionarlas únicamente cuando se vean huevos sobresaliendo de la cloaca. Las hembras que están listas presentan la postura característica con la «cabeza arriba».

2. Con suavidad, pase un dedo por el lateral del pez, hacia la cola, para facilitar la expulsión de un ovisaco en una nueva placa de Petri. Repita el procedimiento en el otro lado y devuelva el pez a su recipiente.

3. Los huevos pueden extenderse (formando una sola capa) con un pincel fino. Es importante intentar exponer la mayor cantidad de huevos posible al esperma, por lo que maximizar el área de la superficie de los huevos le resultará útil. Nota importante: Mantenga los huevos húmedos colocando tejido húmedo a su alrededor (es importante que los huevos no toquen el agua directamente, ya que esto puede endurecer prematuramente el corion e impedir la fertilización). Hay una gran variación en el número de huevos que cada hembra puede producir pero, como promedio, deberían obtenerse unos 150 huevos de una misma hembra grávida.

4. Se extienden 25 µl de esperma en la mezcla de Hank de manera uniforme por toda la superficie de los huevos con ayuda del pincel. Los huevos se endurecerán rápidamente y cambiarán de color (en un minuto) una vez comience la fertilización. Si la cantidad estimada de huevos es superior a 150, repita el procedimiento. De igual manera, si los huevos no se endurecen en un minuto, añada un poco más de esperma. Nota importante: La adición de más esperma no mejora necesariamente la tasa de fertilización.

5. Hay que dejar que los huevos y la solución de esperma «interactúen» durante 15 minutos como mínimo, y los huevos fertilizados deben colocarse en los acuarios de exposición en un periodo de 1,5 horas después de la fertilización.

6. El procedimiento se repite con otra hembra hasta que se recoge el número deseado de huevos.

7. Aparte unos cuantos huevos del último lote y fíjelos en ácido acético al 10 %.

▼M6

**Recuento y distribución de los huevos en los acuarios de ensayo**

1. Los huevos deben distribuirse de manera uniforme entre cada nivel de tratamiento para evitar variaciones genéticas. Cada lote de huevos fertilizados debe separarse en grupos del mismo tamaño (tantos como niveles de tratamiento haya) con un instrumento romo (es decir, pinzas de entomología de lámina ancha o un asa de inoculación). Si el objetivo son cuatro réplicas por tratamiento, con 20 huevos cada una, habrá que distribuir 80 huevos por acuario de exposición. Nota importante: Es recomendable añadir un 20 % extra (es decir, 96 huevos por nivel de tratamiento) hasta que esté seguro de obtener unas tasas de fertilización del 100 %.

2. Los huevos de espinoso son muy proclives a las infecciones fúngicas fuera del nido protegido por el padre. En este sentido, es muy importante el tratamiento de todos los huevos con azul de metileno durante los primeros cinco días del ensayo. Se prepara una solución madre de azul de metileno de 1 mg/ml y se añade al acuario de exposición para obtener una concentración final máxima de 2,125 mg/l. Nota importante: Los espinosos no deben quedar expuestos al azul de metileno una vez se produce la eclosión; por lo tanto, el sistema debe estar libre de azul de metileno al llegar el día 6.

3. Los huevos se inspeccionan cada día y los huevos muertos o no fertilizados deben quedar registrados como tales. Nota importante: Los huevos nunca deben estar fuera del agua hasta que eclosionen, ni siquiera durante periodos muy breves.

▼M6

## C.42. BIODEGRADABILIDAD EN AGUA DE MAR

### INTRODUCCIÓN GENERAL

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 306 de la OCDE (1992). Cuando se desarrollaron los métodos de ensayo originales, no se sabía hasta qué punto podían aplicarse al entorno marino los resultados de los ensayos de cribado de biodegradabilidad fácil con agua dulce, efluente de alcantarillado o lodo activado como inóculo. Se han comunicado resultados variables sobre este aspecto [por ejemplo, (1)].

2. Muchas aguas residuales industriales, que contienen diversas sustancias, llegan al mar por descarga directa o a través de los estuarios y ríos en los que los tiempos de residencia son bajos en comparación con el periodo necesario para que se produzca la biodegradación completa de muchas de las sustancias presentes. Debido a la mayor concienciación sobre la necesidad de proteger el entorno marino frente a las crecientes cargas de sustancias y la necesidad de estimar la concentración probable de sustancias en el mar, se han desarrollado métodos de ensayo de biodegradabilidad en agua de mar.

3. Los métodos descritos en este documento utilizan agua de mar natural como fase acuosa y como fuente de microorganismos. En un intento por cumplir los métodos de biodegradabilidad fácil en agua dulce, se investigó el uso de agua de mar ultrafiltrada y centrifugada, así como el uso de sedimentos marinos como inóculos. Esas investigaciones no tuvieron éxito. El medio de ensayo, por lo tanto, es agua de mar natural pretratada para eliminar las partículas gruesas.

4. A fin de evaluar la biodegradabilidad última con el método del frasco de agitación, deben utilizarse concentraciones relativamente altas de la sustancia problema debido a la poca sensibilidad del método analítico de carbono orgánico disuelto (COD). Esto, a su vez, requiere la adición al agua de mar de nutrientes minerales (N y P), cuyas bajas concentraciones, de lo contrario, limitarían la eliminación del COD. También es necesario añadir los nutrientes con el método del frasco cerrado debido a la concentración de la sustancia problema añadida.

5. Por tanto, los métodos no constituyen pruebas de biodegradabilidad fácil, ya que no se añade ningún inóculo además de los microorganismos que ya están presentes en el agua de mar. Los ensayos tampoco simulan el entorno marino, ya que se añaden los nutrientes y la concentración de la sustancia problema es mucho mayor que la que estaría presente en el mar. Por estos motivos, los métodos se proponen en una nueva subsección llamada «Biodegradabilidad en agua de mar».

### APLICACIÓN

6. Los resultados de los ensayos, que se realizarían porque la pauta de uso y eliminación de la sustancia en cuestión indica una ruta hacia el mar, dan una primera impresión de la biodegradabilidad en agua de mar. Si el resultado es positivo (eliminación del COD superior al 70 %; demanda teórica de oxígeno, DTO, superior al 60 %), se puede concluir que hay potencial de biodegradación en el entorno marino. Sin embargo, un resultado negativo no excluye dicho potencial, sino que indica que se requieren más estudios; por ejemplo, utilizando la concentración más baja posible de la sustancia problema.

▼M6

7. En cualquier caso, si se requiere un valor más definitivo para la tasa o el nivel de biodegradación en agua de mar en una zona concreta, habría que aplicar otros métodos más complejos y sofisticados y, por lo tanto, más caros. Por ejemplo, podría aplicarse un ensayo de simulación con una concentración de la sustancia problema más próxima a la concentración ambiental probable. Asimismo, podría utilizarse agua de mar no enriquecida y no pretratada, obtenida del lugar de interés, y la biodegradación primaria podría ir seguida de un análisis químico específico. En lo que respecta a la biodegradabilidad última, serían necesarias sustancias marcadas con $^{14}C$, de forma que pudieran medirse las tasas de desaparición de $^{14}C$ orgánico soluble y la producción de $^{14}CO_2$ con unas concentraciones ambientalmente realistas.

SELECCIÓN DE LOS MÉTODOS

8. La selección del método que se vaya a utilizar depende de diversos factores. La tabla siguiente se incluye para facilitar la selección. Aunque las sustancias con una hidrosolubilidad inferior al equivalente de unos 5 mg C/l no se pueden analizar con el método del frasco de agitación, al menos en principio, las sustancias poco solubles pueden analizarse con el método del frasco cerrado.

*Tabla*

**Ventajas y desventajas de la prueba del frasco de agitación y del frasco cerrado**

| MÉTODO | VENTAJAS | DESVENTAJAS |
|---|---|---|
| **FRASCO DE AGITACIÓN** | — aparato sencillo, excepto el analizador de C<br>— la duración de 60 días no constituye un problema<br>— no hay interferencias por nitrificación<br>— puede adaptarse para las sustancias volátiles | — requiere un analizador de C<br>— utiliza 5-40 mg COD/1; puede tener un efecto inhibidor<br>— la determinación del COD resulta difícil en concentraciones bajas en agua de mar (efecto de cloruro)<br>— COD alto en ocasiones en agua de mar |
| **FRASCO CERRADO** | — aparato sencillo<br>— determinación final simple<br>— utiliza una concentración baja de la sustancia problema (2 mg/l); por lo tanto, hay menos probabilidades de inhibición<br>— se adapta fácilmente para las sustancias volátiles | — puede resultar difícil mantener la hermeticidad de los frascos<br>— el crecimiento bacteriano en la pared puede provocar valores falsos<br>— los valores de captación en blanco de $O_2$ pueden ser altos, especialmente después de 28 días; se pueden superar envejeciendo el agua de mar<br>— posibles interferencias de la captación de $O_2$ por la nitrificación |

## MÉTODO DEL FRASCO DE AGITACIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Este método es una variante con agua de mar del ensayo de detección de la OCDE modificado que se describe en el capítulo C.4B de este anexo (2). Se concluyó como resultado de un ensayo interlaboratorios organizado para la Comisión Europea (CE) por el Instituto de Calidad del Agua de Dinamarca (3).

2. En común con el método del frasco cerrado para agua marina adjunto, los resultados de este ensayo no se deben considerar indicadores de biodegradabilidad fácil, sino que deben utilizarse específicamente para obtener información sobre la biodegradabilidad de las sustancias en entornos marinos.

▼M6

PRINCIPIO DEL MÉTODO

3. Una cantidad predeterminada de la sustancia problema se disuelve en el medio de ensayo para lograr una concentración de 5-40 mg de carbono orgánico disuelto (COD)/l. Si los límites de sensibilidad de los análisis de carbono orgánico mejoran, el uso de concentraciones más bajas de la sustancia problema puede resultar favorable, en particular en caso de sustancias inhibidoras. La solución de la sustancia problema en el medio del ensayo se incuba con agitación en la oscuridad o en luz difusa, en condiciones aeróbicas, a una temperatura fija (controlada a ± 2 °C) que, normalmente, se encontrará en un intervalo de 15-20 °C. En aquellos casos en los que el objetivo del estudio sea simular situaciones ambientales, se pueden realizar ensayos fuera de este intervalo de temperaturas normales. La duración máxima recomendada del ensayo es de unos 60 días. La degradación va seguida de mediciones del COD (degradación última) y, en algunos casos, mediante análisis específico (degradación primaria).

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

4. A fin de saber si el ensayo puede aplicarse o no a una sustancia concreta, hay que conocer algunas de sus propiedades. El contenido de carbono orgánico de la sustancia debe establecerse, su volatilidad debe ser tal que no se produzcan pérdidas importantes durante el ensayo, y su solubilidad en agua debe ser superior al equivalente de 25-40 mg C/l. Asimismo, la sustancia problema no debe adsorberse de forma significativa sobre superficies de vidrio. La información sobre la pureza o las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia problema es necesaria para poder interpretar los resultados obtenidos, en particular cuando el resultado está próximo al nivel «umbral».

5. La información sobre la toxicidad de la sustancia problema para las bacterias, por ejemplo, como se mide en los ensayos de tasa de respiración a corto plazo (4), puede resultar útil al seleccionar las concentraciones adecuadas del ensayo y puede ser esencial para interpretar correctamente los valores bajos de biodegradación. No obstante, esta información no siempre es suficiente para interpretar los resultados obtenidos en el ensayo de biodegradación y entonces el procedimiento descrito en el punto 18 resulta más adecuado.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

6. Deben utilizarse sustancias de referencia adecuadas para comprobar la actividad microbiana de la muestra de agua de mar. El benzoato sódico, el acetato sódico y la anilina son ejemplos de sustancias que pueden utilizarse con este fin. Las sustancias de referencia deben degradarse en un intervalo de tiempo razonablemente corto; de lo contrario, se recomienda repetir el ensayo con otra muestra de agua de mar.

7. En el ensayo interlaboratorios de la CE, en el que se tomaron muestras de agua de mar en distintos lugares y en momentos distintos del año (3), la fase de latencia ($t_L$) y el tiempo que se tarda en lograr una degradación del 50 % ($t_{50}$), excluida la fase de latencia, fueron de 1 a 4 días y de 1 a 7 días, respectivamente, en relación con el benzoato sódico. En lo que respecta a la anilina, la $t_L$ varió entre 0 y 10 días, mientras que el $t_{50}$ varió entre 1 y 10 días.

REPRODUCIBILIDAD Y SENSIBILIDAD DEL MÉTODO

8. La reproducibilidad del método se estableció en el ensayo interlaboratorios (3). La concentración más baja de la sustancia problema con la cual se puede utilizar este método con análisis del COD está determinada en gran parte por el límite de detección del análisis de carbono orgánico (aproximadamente 0,5 mg C/l en la actualidad) y la concentración de carbono orgánico disuelto en el agua de mar utilizada (generalmente, unos 3-5 mg/l de agua procedente

▼M6

de mar abierto). La concentración de fondo de COD no debe superar aproximadamente el 20 % de la concentración total de COD después de añadir la sustancia problema. Si esto no resulta viable, la concentración de referencia de COD puede reducirse, en ocasiones, envejeciendo el agua de mar antes de realizar el ensayo. Si se usa el método únicamente con un análisis químico específico (mediante el cual se mide la degradación primaria), el investigador debe documentar, suministrando información adicional, si se puede esperar o no la degradabilidad última. Esta información adicional puede consistir en los resultados de otros ensayos de biodegradabilidad fácil o inherente.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

9. Equipo normal de laboratorio, además de lo siguiente:

   a. máquina agitadora compatible con matraces Erlenmeyer de 0,5-2 litros, con control automático de la temperatura o utilizada en una sala a temperatura constante de 15-20 °C, controlada a ± 2 °C,

   b. matraces Erlenmeyer de 0,5-2 litros de cuello estrecho,

   c. aparato de filtración por membrana o centrifugadora,

   d. filtros de membrana de 0,2 a 0,45 μm,

   e. analizador de carbono,

   f. equipo para análisis específicos (opcional).

**Agua de mar**

10. Tome una muestra de agua de mar en un recipiente que se haya limpiado a fondo y transpórtela al laboratorio, preferiblemente en un plazo de uno o dos días desde su recogida. Durante el transporte, no permita que la temperatura de la muestra supere demasiado la temperatura que se vaya a utilizar en el ensayo. Identifique con precisión la ubicación del muestreo y descríbala en términos de su estado de contaminación y nutrientes. En particular en lo que respecta a las aguas costeras, incluya en esta caracterización un recuento de colonias de microbios heterótrofos y la determinación de las concentraciones de nitrato, amonio y fosfato disueltos.

11. Incluya los datos siguientes con respecto a la muestra de agua de mar:

   — fecha de recogida,

   — profundidad a la que se ha tomado la muestra,

   — aspecto de la muestra (turbia, etc.),

   — temperatura en el momento de recogida,

   — salinidad,

   — COD,

   — tiempo transcurrido entre la recogida y el uso en el ensayo.

12. Si el contenido de COD de la muestra de agua de mar resultara ser alto (punto 8), se recomienda envejecer el agua de mar durante una semana antes de usarla. El envejecimiento se realiza en condiciones aeróbicas a la temperatura del ensayo y en la oscuridad o en luz difusa. En caso necesario, mantener las condiciones aeróbicas mediante una aireación suave. Durante

▼M6

el envejecimiento, se reduce el contenido de material orgánico fácilmente degradable. En el ensayo interlaboratorios (3) no se reveló ninguna diferencia entre el potencial de degradación de las muestras de agua de mar envejecidas y recién recogidas. Antes de usarla, trate previamente el agua de mar para eliminar las partículas gruesas, por ejemplo mediante filtración con un filtro de nailon o un filtro de papel grueso (no deben ser filtros de membrana o GF-C), o mediante sedimentación y decantación. Debe indicarse el procedimiento utilizado. Lleve a cabo el tratamiento previo después del envejecimiento, si se utiliza.

**Soluciones madre de nutrientes minerales**

13. Prepare las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de grado analítico:

| | | |
|---|---|---|
| a) | Ortofosfato potásico de dihidrógeno, $KH_2PO_4$ | 8,50 g |
| | Ortofosfato dipotásico de hidrógeno, $K_2HPO_4$ | 21,75 g |
| | Ortofosfato disódico de hidrógeno dihidratado, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ | 33,30 g |
| | Cloruro de amonio, $NH_4Cl$ | 0,50 g |
| | Disuelva y enrase con agua destilada a 1 litro. | |
| b) | Cloruro de calcio, $CaCl_2$ | 27,50 g |
| | Disuelva y enrase con agua destilada a 1 litro. | |
| c) | Sulfato de magnesio heptahidratado, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 22,50 g |
| | Disuelva y enrase con agua destilada a 1 litro. | |
| d) | Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,25 g |
| | Disuelva y enrase con agua destilada a 1 litro. | |

La precipitación en la solución d) puede evitarse añadiendo una gota de HCl concentrado o 0,4 g de ácido etilendiamino (EDTA, sal disódica) por litro. Si se forma un precipitado en una solución madre, cámbiela por una solución recién preparada.

**Preparación del medio de ensayo**

14. Añada 1 ml de cada una de las soluciones madre anteriormente mencionadas por litro de agua de mar pretratada.

**Inóculo**

15. No añada un inóculo concreto además de los microorganismos ya presentes en el agua de mar. Determine (opcionalmente) el número de heterótrofos que formen colonias en el medio de ensayo de agua de mar (y, preferiblemente, también en las muestras originales de agua de mar), por ejemplo mediante recuento de placas, utilizando agar marino. Esto resulta deseable, en particular, con las muestras de lugares costeros o contaminados. Compruebe la actividad microbiana heterotrófica del agua de mar llevando a cabo una prueba con una sustancia de referencia.

▼M6

**Preparación de los frascos**

16. Hay que asegurarse de que todos los recipientes de vidrio estén escrupulosamente limpios, no necesariamente estériles (por ejemplo, utilizando ácido clorhídrico alcohólico), enjuagados y secos antes de usarlos para evitar la contaminación con residuos de ensayos anteriores. Los frascos también deben limpiarse antes de utilizarlos por primera vez.

17. Evalúe las sustancias problema al mismo tiempo en frascos duplicados, junto con un frasco único para la sustancia de referencia. Lleve a cabo un ensayo en blanco, por duplicado, sin sustancia problema y sin sustancia de referencia; para determinar los blancos analíticos. Disuelva las sustancias problema en el medio del ensayo (puede añadirse cómodamente mediante una solución madre concentrada) para obtener las concentraciones iniciales deseadas que, normalmente, son de 5-40 mg COD/l. Evalúe la sustancia de referencia, normalmente a una concentración inicial correspondiente a 20 mg de COD/l. Si se utilizan las soluciones madre de las sustancias problema o de referencia, hay que asegurarse de que la salinidad del medio de agua de mar no se modifique demasiado.

18. Si se prevén efectos tóxicos, o no pueden descartarse, puede ser recomendable incluir un experimento de inhibición, por duplicado, en el diseño del ensayo. Añada las sustancias problema y de referencia al mismo recipiente; normalmente, la concentración de la sustancia de referencia es la misma que en el ensayo de control (es decir, 20 mg COD/l) para permitir la comparación.

19. Aporte cantidades adecuadas de las soluciones de ensayo en los matraces Erlenmeyer (aproximadamente la mitad del volumen del frasco constituye una cantidad adecuada) y, posteriormente, ponga una tapa suelta en cada frasco (por ejemplo, papel de aluminio) que permita el intercambio de gases entre el frasco y el entorno. (Si se va a utilizar el análisis de COD, los tapones de algodón no son adecuados.) Coloque los recipientes en el agitador y agite continuamente a una velocidad suave (por ejemplo, 100 rpm) durante todo el ensayo. Controle la temperatura (15-20 °C, con un margen de ± 2 °C) y proteja los recipientes de la luz para evitar que aparezcan algas. Hay que asegurarse de que el aire esté libre de materiales tóxicos.

**Ensayo de control fisicoquímico (opcional)**

20. Si se sospecha de la existencia de mecanismos abióticos de degradación o pérdida, como la hidrólisis (que constituye un problema solo con los análisis específicos), la volatilización o la adsorción, se recomienda realizar un experimento de control fisicoquímico. Esto se puede llevar a cabo añadiendo cloruro de mercurio (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50-100 mg/l) a los recipientes con sustancia problema para detener la actividad microbiana. Una reducción importante del COD o de la concentración de una sustancia específica en el ensayo de control fisicoquímico indica la presencia de mecanismos de eliminación abióticos. Si se utiliza cloruro de mercurio, debe prestarse atención a las interferencias o al envenenamiento catalítico en el análisis de COD.

**Número de frascos**

21. En una serie típica se usan los siguientes frascos:

Frascos 1 y 2 : contienen la sustancia problema (suspensión de ensayo).

Frascos 3 y 4 : contienen solo agua de mar (blanco).

Frasco 5 : contiene la sustancia de referencia (control del procedimiento).

Frasco 6 : contiene la sustancia problema y la de referencia (control de toxicidad); es opcional.

Frasco 7 : contiene la sustancia problema y un agente de esterilización (control estéril abiótico); es opcional.

([1]) El cloruro de mercurio (II) ($HgCl_2$) es una sustancia muy tóxica que debe manipularse con las precauciones correspondientes. Los residuos acuosos que contengan esta sustancia deben eliminarse adecuadamente; no deben descargarse en el sistema de desagüe.

▼M6

**Análisis de COD**

22. En el transcurso del ensayo, retire muestras a intervalos adecuados para analizar el COD (apéndice 1). Siempre se deben recoger las muestras al principio del ensayo (día 0) y el día 60. En total se necesita un mínimo de cinco muestras para describir el transcurso de la degradación. No se puede establecer un calendario fijo de muestreo, ya que la tasa de biodegradación varía. Lleve a cabo la determinación COD por duplicado en cada muestra.

**Muestreo**

23. El volumen necesario de las muestras depende del método de análisis (análisis específico), del analizador de carbono utilizado y del procedimiento (filtración por membrana o centrifugado) que se seleccionen para el tratamiento de las muestras antes de determinar el carbono (puntos 25 y 26). Antes de realizar el muestreo, hay que asegurarse de que el medio del ensayo se mezcle bien y que cualquier material adherido a la pared del frasco quede disuelto o suspendido.

24. Filtre por membrana o centrifugue inmediatamente después del muestreo. En caso necesario, conserve las muestras filtradas o centrifugadas a 2-4 °C, durante 48 horas como máximo, o por debajo de los -18 °C durante periodos más largos (si se sabe que la sustancia no se verá afectada, acidifique hasta un pH 2 antes de guardar las muestras).

25. Los filtros de membrana (0,2-0,45 μm) resultan adecuados si se garantiza que no liberan carbono ni adsorben la sustancia en la fase de filtrado; por ejemplo, filtros de membrana de policarbonato. Algunos filtros de membrana están impregnados de agentes tensioactivos para la hidrofilización y pueden liberar cantidades considerables de carbono disuelto. Prepare estos filtros hirviéndolos en agua desionizada durante tres periodos consecutivos, cada uno de una hora. Tras la ebullición, conserve los filtros en agua desionizada. Elimine los 20 primeros ml del filtrado.

26. El centrifugado de las muestras puede elegirse como alternativa a la filtración por membrana. Centrifugue a 40 000 $ms^{-2}$ (~ 4 000 g) durante 15 minutos, preferiblemente en una centrífuga refrigerada.

*Nota:* La diferenciación del carbono orgánico total (COT) con respecto al COD (COT/COD) mediante centrifugado a concentraciones muy bajas no parece funcionar, ya que bien no se eliminan todas las bacterias o bien se vuelve a disolver carbono como parte del plasma bacteriano. Con concentraciones del ensayo más altas (más de 10 mg C por litro), el error de centrifugado parece ser comparativamente pequeño.

**Frecuencia de muestreo**

27. Si los análisis se realizan inmediatamente después del muestreo, evalúe el tiempo de muestreo siguiente teniendo en cuenta el resultado de la determinación analítica.

28. Si las muestras se conservan (punto 24) para un análisis posterior, recoja más muestras del mínimo necesario de cinco. Analice en primer lugar las últimas muestras y, con una selección gradual «hacia atrás» de las muestras apropiadas para el análisis, se puede obtener una buena descripción de la curva de biodegradación con un número relativamente pequeño de determinaciones analíticas. Si no se ha producido degradación al final del ensayo, no es necesario analizar más muestras y, en ese caso, la estrategia «hacia atrás» puede ahorrar importantes costes analíticos.

▼M6

29. Si se observa una meseta en la curva de degradación antes del día 60, finalice el ensayo. Si la degradación ya ha empezado de manera evidente el día 60, pero no ha alcanzado una meseta, amplíe el experimento durante un tiempo adicional.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

30. Registre los resultados analíticos en la ficha de datos adjunta (apéndice 2) y calcule los valores de biodegradación tanto de la sustancia problema como de la sustancia de referencia a partir de la ecuación siguiente:

$$D_t = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}}\right] \times 100$$

donde:

$D_t$ = degradación porcentual de COD o eliminación de sustancia específica en el tiempo t.

$C_o$ = concentración inicial de COD o de la sustancia específica en el medio de ensayo.

$C_t$ = concentración de COD o de la sustancia específica en el medio de ensayo en el tiempo t.

$C_{bl(0)}$ = concentración inicial de COD o de la sustancia específica en el blanco.

$C_{bl(t)}$ = concentración de COD o de la sustancia específica en el blanco en el tiempo t.

31. Establezca la degradación como el porcentaje de eliminación de COD (degradación última) o de eliminación de la sustancia específica (degradación primaria) en el tiempo t. Calcule las concentraciones de COD con precisión de 0,1 mg por litro y redondee las medias de los valores $D_t$ al porcentaje entero más próximo.

32. Ilustre gráficamente el curso de la degradación en un diagrama, tal y como se indica en la figura «Validez e interpretación de los resultados». Si no hay suficientes datos, calcule a partir de la curva la fase de latencia ($t_L$) y el tiempo necesario para alcanzar la eliminación del 50 % a partir del final de la fase de latencia ($t_{50}$).

**Informe del ensayo**

33. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas,

— datos de identificación.

*Condiciones de ensayo:*

— ubicación y descripción del lugar de muestreo; estado de contaminación y de nutrientes (recuento de colonias, nitrato, amonio y fosfato, si procede),

— características de la muestra (fecha de muestreo, profundidad, aspecto, temperatura, salinidad), COD (opcional), tiempo transcurrido entre la recogida y el uso en el ensayo,

▼M6

— método utilizado (si procede) para envejecer el agua de mar,

— método utilizado en el tratamiento previo (filtración o sedimentación) del agua de mar,

— método utilizado para determinar el COD,

— método utilizado para el análisis específico (opcional),

— método utilizado para determinar el número de heterótrofos en el agua de mar (método de recuento de placas o procedimiento alternativo) (opcional),

— otros métodos (opcionales) utilizados para caracterizar el agua de mar (mediciones de ATP, etc.).

*Resultados:*

— datos analíticos indicados en una ficha de datos (apéndice 2),

— el curso del ensayo de degradación se representa gráficamente en un diagrama que muestre la fase de latencia ($t_L$), la pendiente y el tiempo (a partir del final de la fase de latencia) hasta alcanzar la eliminación del 50 % ($t_{50}$). La fase de latencia puede estimarse gráficamente como se indica en la figura de la sección «Validez e interpretación de los resultados», o se puede considerar más fácil como el tiempo necesario para una degradación del 10 %,

— porcentaje de degradación medido cuando han transcurrido 60 días o al final del ensayo.

*Discusión de los resultados.*

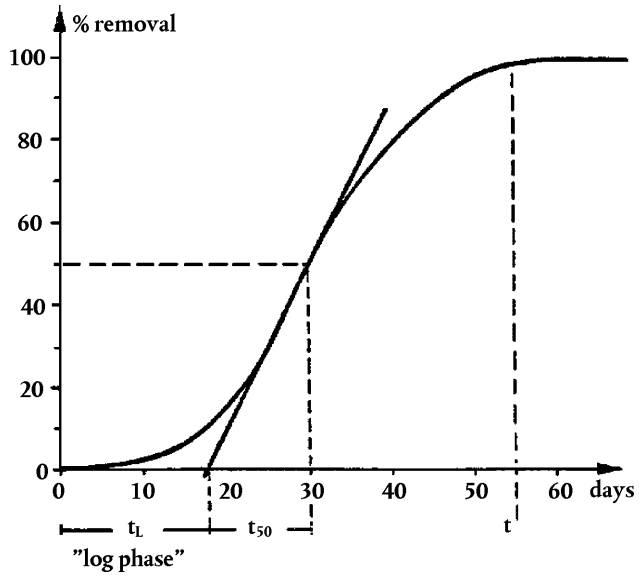
**Validez e interpretación de los resultados**

34. Los resultados obtenidos con las sustancias de referencia como, por ejemplo, benzoato sódico, acetato sódico o anilina, deben ser comparables con los resultados obtenidos en el ensayo interlaboratorios (3) (véase la sección «Sustancias de referencia», punto 7). Si los resultados obtenidos con las sustancias de referencia son atípicos, el ensayo deberá repetirse utilizando otra muestra de agua de mar. Aunque es posible que los resultados de los ensayos de inhibición no siempre puedan interpretarse fácilmente debido a la contribución de COD por la sustancia problema, una reducción importante de la velocidad de eliminación de COD total, en comparación con la de control, constituye un signo positivo de efectos tóxicos.

35. Debido a las concentraciones de ensayo relativamente altas que se utilizan en comparación con los sistemas más naturales (y, consiguientemente, a la proporción desfavorable entre las concentraciones de las sustancias problema y otras fuentes de carbono), el método debe considerarse como una prueba preliminar que se puede utilizar para indicar si una sustancia es o no fácilmente biodegradable. Por consiguiente, un resultado bajo no significa necesariamente que la sustancia problema no sea biodegradable en los entornos marinos, sino que indica que será necesario trabajar más para establecerlo.

En la figura siguiente se presenta un ejemplo de experimento de degradación teórico que ilustra una forma viable de estimar los valores de $t_L$ (duración de la «fase de latencia») y $t_{50}$ (intervalo de tiempo, a partir de $t_L$), necesario para alcanzar una eliminación del 50 %.

▼M6




**MÉTODO DEL FRASCO CERRADO**

INTRODUCCIÓN

1. Este método es una variante con agua de mar del ensayo del frasco cerrado (5) y se estableció como resultado de un ensayo interlaboratorios organizado para la Comisión Europea (CE) por el Instituto de Calidad del Agua de Dinamarca (3).

2. En común con el método del frasco de agitación marino adjunto, los resultados de este ensayo no se deben considerar indicaciones de biodegradabilidad fácil, sino que deben utilizarse específicamente para obtener información sobre la biodegradabilidad de las sustancias en entornos marinos.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

3. Una cantidad predeterminada de la sustancia problema se disuelve en el medio de ensayo en una concentración habitualmente de 2-10 mg de sustancia problema por litro (se pueden utilizar una o varias concentraciones). La solución se conserva en un frasco cerrado lleno en la oscuridad, en un baño a temperatura constante o en un entorno cerrado controlado a ± 1 °C, en un intervalo de 15-20 °C. En aquellos casos en los que el objetivo del estudio sea simular situaciones ambientales, se pueden realizar ensayos fuera de este intervalo de temperaturas normales, siempre que se realicen los ajustes adecuados para controlar la temperatura. La degradación se sigue mediante análisis del oxígeno durante un periodo de 28 días.

4. El ensayo interlaboratorios demostró que si el ensayo se ampliaba a más de 28 días no podía recopilarse información útil, en la mayoría de los casos, debido a interferencias graves. Los valores de demanda biológica de oxígeno (DBO) en blanco eran excesivamente altos, probablemente debido al crecimiento en la pared, provocado por la falta de agitación, y a la nitrificación. Por lo tanto, la duración recomendada es de 28 días pero, si el valor de DBO en blanco se mantiene dentro del límite del 30 % (puntos 15 y 40), el ensayo podría prolongarse.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

5. A fin de saber si el ensayo puede aplicarse o no a una sustancia concreta, hay que conocer algunas de sus propiedades. La fórmula empírica es necesaria para calcular la demanda teórica de oxígeno (DTO) (véase el apéndice 3); de lo contrario, se debe calcular la demanda química de oxígeno (DQO) de la sustancia para que sirva de valor de referencia. El uso de la DQO es menos satisfactorio, ya que algunas sustancias no se oxidan completamente en la prueba de DQO.

▼M6

6. La solubilidad de la sustancia debe ser, como mínimo, de 2 mg/l, aunque en principio se pueden analizar sustancias menos solubles (por ejemplo, con un baño de ultrasonidos), así como sustancias volátiles. Disponer de información sobre la pureza o las proporciones relativas de los principales componentes de la sustancia problema es necesario para poder interpretar los resultados obtenidos, en particular cuando el resultado está próximo al nivel «umbral».

7. La información sobre la toxicidad de la sustancia para las bacterias, por ejemplo, como se mide en las pruebas de respiración a corto plazo (4), puede resultar muy útil para seleccionar las concentraciones adecuadas del ensayo y puede ser esencial para interpretar correctamente los valores bajos de biodegradación. No obstante, esta información no siempre es suficiente para interpretar los resultados obtenidos en el ensayo de biodegradación y el procedimiento descrito en el punto 27 resulta más adecuado.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

8. Deben utilizarse sustancias de referencia adecuadas para comprobar la actividad microbiana de la muestra de agua de mar. Para ello se puede utilizar anilina, acetato sódico o benzoato sódico, por ejemplo. Se debe producir una degradación de estas sustancias, al menos del 60 % (de su DTO), en un intervalo de tiempo razonablemente corto; de lo contrario, se recomienda que el ensayo se repita con otra muestra de agua de mar.

9. En el ensayo interlaboratorios de la CE, en el que se tomaron muestras de agua de mar en distintos lugares y en momentos distintos del año, la fase de latencia ($t_L$) y el tiempo que se tarda en lograr una degradación del 50 % ($t_{50}$), excluida la fase de latencia, fueron de 0 a 2 días y de 1 a 4 días, respectivamente, en relación con el benzoato sódico. En lo que respecta a la anilina, los valores de $t_L$ y $t_{50}$ fueron de 0 a 7 y de 2 a 12 días, respectivamente.

REPRODUCIBILIDAD

10. La reproducibilidad de los métodos se estableció en el ensayo interlaboratorios de la CE (3).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

11. Equipo normal de laboratorio, además de lo siguiente:

a) se pueden utilizar frascos de DBO de 250 a 300 ml, con tapones de vidrio, o un frasco de cuello estrecho de 250 ml con tapones de vidrio;

b) varios frascos de 2, 3 y 4 litros, con marcas de litro, para preparar el experimento y llenar los frascos de DBO;

c) baño de agua o sala a temperatura constante para mantener los frascos a una temperatura constante (± 1 °C), sin luz;

d) equipo para analizar el oxígeno disuelto;

e) filtros de membrana de 0,2-0,45 μm (opcional);

f) equipo para análisis específicos (opcional).

**Agua de mar**

12. Recoja una muestra de agua de mar en un recipiente que se haya limpiado a fondo y transpórtela al laboratorio, preferiblemente en un plazo de uno o dos días desde su recogida. Durante el transporte, no permita que la temperatura de la muestra supere demasiado la temperatura que se vaya a utilizar en el ensayo.

▼**M6**

13. Identifique con precisión la ubicación del muestreo y descríbala en términos de su estado de contaminación y nutricional. En particular en lo que respecta a las aguas costeras o contaminadas, incluya en esta caracterización un recuento de colonias de microbios heterótrofos y la determinación de las concentraciones de nitrato, amonio y fosfato disueltos.

14. Incluya los datos siguientes con respecto a la muestra de agua de mar:

— fecha de recogida,

— profundidad a la que se ha tomado la muestra,

— aspecto de la muestra (turbia, etc.),

— temperatura en el momento de recogida,

— salinidad,

— carbono orgánico disuelto (COD),

— tiempo transcurrido entre la recogida y el uso en el ensayo.

15. Si el contenido en COD de la muestra resulta ser alto, o si se cree que la DBO en blanco tras 28 días puede ser superior al 30 % de la de las sustancias de referencia, se recomienda envejecer el agua de mar aproximadamente durante una semana antes de usarla.

16. Envejezca la muestra conservándola en condiciones aeróbicas a la temperatura del ensayo y en la oscuridad o en luz difusa. En caso necesario, mantenga las condiciones aeróbicas mediante una aireación suave. Durante el envejecimiento, se reduce el contenido de material orgánico fácilmente degradable. En el ensayo interlaboratorios (3) no se reveló ninguna diferencia entre el potencial de degradación de las muestras de agua de mar envejecidas y recién recogidas.

17. Antes de usarla, trate previamente el agua de mar para eliminar las partículas gruesas, por ejemplo con un filtro de nailon o un filtro de papel grueso (no deben ser filtros de membrana o GF-C), o mediante sedimentación y decantación. Indique el procedimiento utilizado. Aplique el tratamiento previo después del envejecimiento, si se va a utilizar.

**Soluciones madre de nutrientes minerales**

18. Prepare las siguientes soluciones madre, utilizando reactivos de grado analítico:

| | | |
|---|---|---|
| a) | Ortofosfato potásico de dihidrógeno, $KH_2PO_4$ | 8,50 g |
| | Ortofosfato dipotásico de hidrógeno, $K_2HPO_4$ | 21,75 g |
| | Ortofosfato disódico de hidrógeno dihidratado, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ | 33,30 g |
| | Cloruro de amonio, $NH_4Cl$ | 0,50 g |
| | Disuelva y enrase con agua destilada a 1 litro. | |
| b) | Cloruro de calcio, $CaCl_2$ | 27,50 g |
| | Disuelva y enrase con agua destilada a 1 litro. | |
| c) | Sulfato de magnesio heptahidratado, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 22,50 g |
| | Disuelva y enrase con agua destilada a 1 litro. | |
| d) | Cloruro de hierro (III) hexahidratado, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0,25 g |
| | Disuelva y enrase con agua destilada a 1 litro. | |

▼M6

La precipitación en la solución d) puede evitarse añadiendo una gota de HCl concentrado o 0,4 g de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, sal disódica) por litro. Si se forma un precipitado en una solución madre, cámbiela por una solución recién preparada.

**Preparación del medio de ensayo**

19. Añada, por litro de agua de mar pretratada, 1 ml de cada una de las soluciones madre anteriormente mencionadas. Sature el medio de ensayo con aire, a la temperatura del ensayo, aireando con aire comprimido limpio durante unos 20 minutos. Determine la concentración de oxígeno disuelto por motivos de control. La concentración saturada de oxígeno disuelto en función de la salinidad y la temperatura puede leerse en el nomograma incluido con este método de ensayo (apéndice 4).

**Inóculo**

20. No añada un inóculo concreto además de los microorganismos ya presentes en el agua de mar. Determine (opcionalmente) el número de heterótrofos que formen colonias en el medio de ensayo de agua de mar (y, preferiblemente, también en la muestra original de agua de mar), por ejemplo mediante recuento en placas, utilizando agar marino. Esto resulta deseable en particular con las muestras de lugares costeros o contaminados. Compruebe la actividad microbiana heterótrofa del agua de mar llevando a cabo una prueba con una sustancia de referencia.

**Preparación de los frascos de ensayo**

21. Realice todas las manipulaciones necesarias, incluyendo el envejecimiento y el tratamiento previo del agua de mar, a la temperatura de ensayo seleccionada, entre 15 y 20 °C, garantizando la limpieza, pero no la esterilidad, de todos los recipientes de vidrio.

22. Prepare grupos de frascos de DBO para la determinación de la DBO de las sustancias problema y de referencia en series experimentales simultáneas. Realice todos los análisis en frascos duplicados (en blanco y sustancias de referencia y problema); es decir, prepare dos frascos para cada determinación. Realice los análisis como mínimo los días 0, 5, 15 y 28 (cuatro determinaciones). Para realizar los análisis de oxígeno, cuatro determinaciones requieren un total de $3 \times 2 \times 4 = 24$ frascos (en blanco y sustancias de referencia y problema), y, por lo tanto, unos 8 litros de medio de ensayo (para una concentración de sustancia de ensayo).

23. Prepare soluciones separadas de las sustancias problema y de referencia en grandes frascos de volumen suficiente (punto 11), primero añadiendo las sustancias problema y de referencia, directamente o mediante una solución madre concentrada, a los frascos parcialmente llenos. Añada más medio de ensayo para conseguir las concentraciones finales deseadas. Si se utilizan soluciones madre de las sustancias problema o de referencia, hay que asegurarse de que la salinidad del medio de agua de mar no se modifique demasiado.

24. Seleccione las concentraciones de las sustancias problema y de referencia, teniendo en cuenta lo siguiente:

a) la solubilidad del oxígeno disuelto en el agua de mar a la temperatura del ensayo y la salinidad predominantes (véase el nomograma incluido en el apéndice 4),

b) la DBO en blanco del agua de mar, y

c) la biodegradabilidad prevista de la sustancia problema.

▼M6

25. A 15 °C y 20 °C y una salinidad de 32 partes por mil (agua oceánica), la solubilidad del oxígeno disuelto es aproximadamente de 8,1 y 7,4 mg/l, respectivamente. El consumo de oxígeno del agua de mar en sí (respiración en blanco) puede ser de 2 mg $O_2$/l o más, si no se ha envejecido el agua de mar. Por ello, para garantizar una concentración de oxígeno significativa restante después de la oxidación de la sustancia problema, hay que utilizar una concentración inicial de la sustancia problema de unos 23 mg/l (dependiendo de la DTO) en caso de sustancias de las cuales se espera que se degraden completamente en las condiciones del ensayo (como las sustancias de referencia). Evalúe las sustancias menos degradables a concentraciones mayores, de unos 10 mg/l como máximo, siempre que no se produzcan efectos tóxicos. Puede resultar útil realizar ensayos paralelos con una concentración baja (unos 2 mg/l) y alta (unos 10 mg/l) de la sustancia problema.

26. Debe determinarse un blanco de oxígeno en paralelo en frascos que no contengan ni la sustancia problema ni la de referencia.

27. Si se van a determinar efectos inhibidores, prepare la siguiente serie de soluciones en frascos de gran tamaño separados (punto 13):

a) 2 mg por litro de una sustancia fácilmente degradable; por ejemplo, cualquiera de las sustancias de referencia mencionadas,

b) x mg por litro de la sustancia problema (x es habitualmente 2),

c) 2 mg por litro de la sustancia fácilmente degradable más x mg por litro de la sustancia problema.

**Ensayo de control fisicoquímico (opcional)**

28. Si se selecciona la opción de usar análisis específicos, se puede realizar un experimento fisicoquímico para comprobar si la sustancia problema se elimina mediante mecanismos abióticos, como la hidrólisis o la adsorción. Se puede llevar a cabo un ensayo de control fisicoquímico añadiendo cloruro de mercurio (II) ($HgCl_2$) ([1]) (50–100 mg/l) a frascos duplicados con sustancia problema para detener la actividad microbiana. Una reducción importante de la concentración de una sustancia específica durante el ensayo indica la presencia de mecanismos de eliminación abióticos.

**Número de frascos de DBO en una serie típica**

29. En una serie típica se usan los siguientes frascos:

— al menos ocho que contengan la sustancia problema,

— al menos ocho que contengan únicamente el agua de mar enriquecida con nutrientes,

— al menos ocho que contengan la sustancia de referencia, y cuando sea necesario,

— seis frascos que contengan las sustancias problema y de referencia (control de toxicidad). PROCEDIMIENTO

30. Tras su preparación, inyecte inmediatamente con sifón cada solución, desde el cuarto más bajo (no desde el fondo) del frasco grande adecuado, para llenar el grupo de frascos de DBO correspondiente. Analice inmediatamente los controles a cero (tiempo cero) para determinar el oxígeno disuelto (punto 33) o consérvelos para realizar un análisis químico posterior mediante precipitación con $MnCl_2$ [cloruro de manganeso (II)] y NaOH (hidróxido sódico).

([1]) El cloruro de mercurio (II) ($HgCl_2$) es una sustancia muy tóxica que debe manipularse con las precauciones correspondientes. Los residuos acuosos que contengan esta sustancia deben eliminarse adecuadamente; no deben verterse directamente al sistema de desagüe.

▼M6

31. Incube los frascos de DBO paralelos restantes a la temperatura del ensayo (15-20 °C), manténgalos en la oscuridad y retírelos de la zona de incubación a intervalos de tiempo adecuados (por ejemplo, tras 5, 15 y 28 días, como mínimo) y lleve a cabo un análisis para determinar el nivel de oxígeno disuelto (punto 33).

32. Filtre con membrana (0,2-0,45 μm) o centrifugue durante 15 minutos las muestras para hacer los análisis específicos (opcional). Consérvelas, como máximo, durante 48 horas a 2-4 °C, o durante periodos más largos a – 18 °C, si no se van a analizar inmediatamente (si se sabe que la sustancia problema no se va a ver afectada, acidifique hasta un valor de pH 2 antes de guardarlas).

**Determinación del oxígeno disuelto**

33. Determine la concentración de oxígeno disuelto mediante un método químico o electroquímico reconocido nacional o internacionalmente.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

34. Registre los resultados analíticos en las fichas de datos adjuntas (apéndice 5).

35. Calcule la DBO como la diferencia de la reducción de oxígeno entre un blanco y una solución de la sustancia problema en las condiciones del ensayo. Divida la reducción de oxígeno neta entre la concentración (p/v) de la sustancia para expresar la DBO en forma de mg de DBO/mg de la sustancia problema. La degradación se define como la proporción de la demanda bioquímica de oxígeno con respecto a, preferiblemente, la demanda teórica de oxígeno (DTO) o la demanda química de oxígeno (DQO), expresada en forma de porcentaje (véase el punto 36).

36. Calcule los valores de biodegradación de cada tiempo de muestreo, tanto para la sustancia problema como para la de referencia, con cualquiera de las ecuaciones siguientes:

$$\%\ biodegradación = \frac{mg\ O_2/mgsustancia\ problema}{mg\ DTO/mgsustancia\ problema} \times 100$$

$$\%\ biodegradación = \frac{mg\ O_2/mgsustancia\ problema}{mg\ DQO/mgsustancia\ problema} \times 100$$

donde:

DTO = demanda teórica de oxígeno (calculada, apéndice 3)

DQO = demanda química de oxígeno, determinada experimentalmente

*Nota:* En ocasiones, las dos formas de cálculo (porcentaje de la DTO o porcentaje de la DQO) no dan los mismos resultados; es preferible utilizar la DTO, ya que algunas sustancias no se oxidan completamente en el ensayo de DQO.

37. Ilustre gráficamente el curso de la degradación en un diagrama (puede consultar un ejemplo en la sección «Validez e interpretación de los resultados»). Si no hay suficientes datos, calcule la fase de latencia ($t_L$) y el tiempo ($t_{50}$) para alcanzar la eliminación del 50 % a partir del final de la fase de latencia utilizando la curva de biodegradación.

38. Si se utilizan análisis específicos (opcional), indique el porcentaje de degradación primaria como porcentaje de eliminación de la sustancia específica en el periodo del ensayo (corregido para tener en cuenta los blancos analíticos).

▼M6

**Informe del ensayo**

39. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas;

— datos de identificación.

*Condiciones de ensayo:*

— ubicación y descripción del lugar de muestreo: estado de contaminación y nutrientes (recuento de colonias, nitrato, amonio y fosfato, si procede);

— características de la muestra (fecha de muestreo, profundidad, aspecto, temperatura, salinidad), COD (opcional), tiempo transcurrido entre la recogida y el uso en el ensayo;

— método utilizado (si procede) para envejecer el agua de mar;

— método utilizado en el tratamiento previo (filtración o sedimentación) del agua de mar;

— método utilizado para determinar la DQO (si se realiza);

— método utilizado para medir el oxígeno;

— procedimiento de dispersión de las sustancias poco solubles en las condiciones del ensayo;

— método utilizado para determinar el número de heterótrofos en el agua de mar (método de recuento en placas o procedimiento alternativo);

— método utilizado para determinar el COD en agua de mar (opcional);

— método utilizado para el análisis específico (opcional);

— otros métodos opcionales utilizados para caracterizar el agua de mar (mediciones de ATP, etc.).

*Resultados:*

— datos analíticos indicados en una ficha de datos (adjunta en el apéndice 5);

— el curso del ensayo de degradación se representa gráficamente en un diagrama que muestre la fase de latencia ($t_L$), la pendiente y el tiempo (a partir del final de la fase de latencia) hasta alcanzar el 50 % de la absorción de oxígeno final provocada por la oxidación de la sustancia problema ($t_{50}$). La fase de latencia puede estimarse gráficamente como se indica en la figura adjunta, o se puede considerar más fácilmente como el tiempo necesario para una degradación del 10 %;

— porcentaje de degradación medida tras 28 días.

*Discusión de los resultados.*

**Validez e interpretación de los resultados**

40. La respiración en blanco no debe superar el 30 % del oxígeno en el frasco del ensayo. Si no se puede satisfacer este criterio utilizando agua de mar recién recogida, debe envejecerse (estabilizarse) el agua de mar antes de usarla.

41. Debe tenerse en cuenta la posibilidad de que las sustancias que contienen nitrógeno pueden afectar a los resultados.

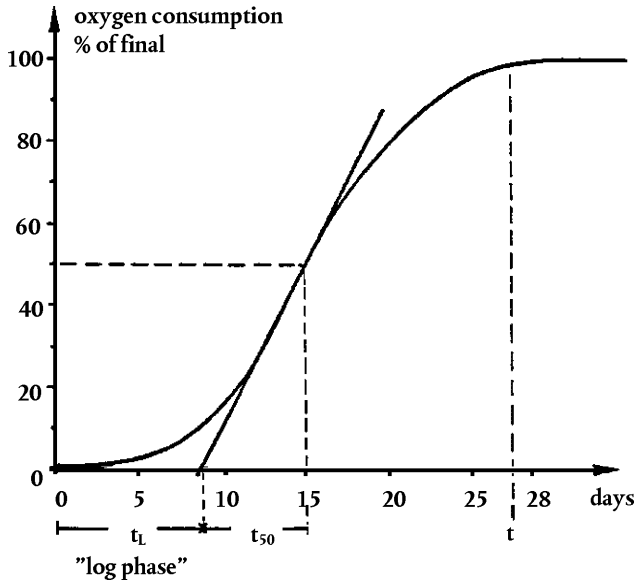
▼M6

42. Los resultados obtenidos con las sustancias de referencia, benzoato sódico y anilina, deben ser comparables con los resultados obtenidos en el ensayo interlaboratorios (3) (punto 9). Si los resultados obtenidos con las sustancias de referencia son atípicos, el ensayo deberá repetirse utilizando otra muestra de agua de mar.

43. La sustancia problema puede considerarse inhibidora para las bacterias (en la concentración utilizada) si la DBO de la mezcla de sustancias de referencia y problema es inferior a la suma de la DBO de las soluciones de las dos sustancias por separado.

44. Debido a las concentraciones del ensayo relativamente altas en comparación con la mayoría de los sistemas naturales y, consiguientemente, a la proporción desfavorable entre las concentraciones de la sustancia problema y otras fuentes de carbono, el método debe considerarse como una prueba preliminar que se puede utilizar para indicar si una sustancia es o no fácilmente biodegradable. Por consiguiente, un resultado bajo no significa necesariamente que la sustancia problema no sea biodegradable en los entornos marinos, sino que indica que será necesario realizar más estudios para establecerlo.

A continuación se presenta un ejemplo de un experimento de degradación teórica que ilustra una forma viable de estimar los valores de $t_L$ (longitud de la «fase de latencia») y $t_{50}$, el intervalo de tiempo (que comienza en $t_L$), necesarios para alcanzar el 50 % de la absorción de oxígeno final provocada por la oxidación de la sustancia problema:




BIBLIOGRAFÍA

(1) de Kreuk J.F. and Hanstveit A.O. (1981). Determination of the biodegradability of the organic fraction of chemical wastes. Chemosphere, 10 (6); 561-573.

(2) Capítulo C.4-B del presente anexo. Determinación de biodegradabilidad «fácil», parte III, ensayo de detección de la OCDE modificado.

(3) Nyholm N. and Kristensen P. (1987). Screening Test Methods for Assessment of Biodegradability of Chemical Substances in Seawater. Final Report of the ring test programme 1984-1985, marzo de 1987, Comisión de las Comunidades Europeas.

(4) Capítulo C.11 del presente anexo. Biodegradación. Lodo activado: prueba de inhibición de la respiración.

(5) Capítulo C.4-E del presente anexo. Determinación de la biodegradabilidad «fácil», parte VI, ensayo del frasco cerrado.

▼M6

*Apéndice 1*

**Determinación del carbono orgánico en agua de mar**

MÉTODO DEL FRASCO DE AGITACIÓN

Para determinar el carbono orgánico de una muestra de agua, los compuestos orgánicos de la muestra se oxidan para producir dióxido de carbono, generalmente utilizando una de las tres técnicas siguientes:

— oxidación húmeda por persulfato/irradiación UV;

— oxidación húmeda por persulfato/temperatura alta (116-130 °C);

— combustión.

El $CO_2$ formado se cuantifica por espectrometría de infrarrojos o volumetría. Otra posibilidad es que el $CO_2$ se reduzca a metano, que se cuantifica en un detector de ionización de llama (FID).

El método de persulfato/UV se utiliza habitualmente para analizar agua «limpia» con un bajo contenido en partículas. Los dos últimos métodos pueden aplicarse a la mayoría de los tipos de muestras de agua, ya que la oxidación por persulfato/temperatura alta es la más adecuada para las muestras de bajo nivel, y la técnica de combustión se puede aplicar a las muestras con un contenido de carbono orgánico no volátil (CONV) muy por encima de 1 mg C/l.

**Interferencias**

Los tres métodos dependen de la eliminación o la compensación del carbono inorgánico (CI) presente en la muestra. La purga de $CO_2$ de la muestra acidificada es el método que se utiliza con mayor frecuencia para eliminar el CI, aunque esto también provoca una pérdida de compuestos orgánicos volátiles (1). La eliminación completa o la compensación del CI deben garantizarse para cada matriz de la muestra y el carbono orgánico volátil (COV) debe determinarse además del CONV, en función del tipo de muestra.

Las concentraciones altas de cloruro dan como resultado una reducción de la eficacia de la oxidación con el método de persulfato/UV (2). Sin embargo, la aplicación de un reactivo de oxidación modificado por la adición de nitrato de mercurio (II) puede eliminar esta interferencia. Se recomienda utilizar el máximo volumen de muestra tolerable para evaluar cada tipo de muestra que contenga cloruro. Las concentraciones altas de sal en la muestra analizada mediante el método de combustión pueden provocar que el catalizador se cubra de sal y una corrosión excesiva del tubo de combustión. Se deben tomar las precauciones indicadas en el manual del fabricante.

Las muestras muy turbias, así como las muestras que contienen partículas, pueden oxidarse de forma incompleta cuando se utiliza el método de persulfato/UV.

**Ejemplo de método adecuado**

El carbono orgánico no volátil se determina mediante oxidación con persulfato/irradiación UV y la consiguiente cuantificación del $CO_2$ formado mediante espectrometría de infrarrojos no dispersiva.

El reactivo de oxidación se modifica de acuerdo con las sugerencias que se dan en (2), tal y como se describe en el manual del fabricante:

a) 8,2 g de $HgCl_2$ y 9,6 g de $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ se disuelven en varios cientos de mililitros de agua de reactivo con baja concentración de carbono.

b) 20 g de $K_2S_2O_8$ se disuelven en la solución con sales de mercurio.

▼**M6**

c) Se añaden a la mezcla 5 ml de $HNO_3$ (conc.).

d) El reactivo se diluye hasta llegar a 1 000 ml.

La interferencia del cloruro se elimina utilizando un volumen de muestra de 40 µl para un contenido de cloruro del 10 %, y un volumen de muestra de 200 µl para un contenido de cloruro al 1,9 %. Se pueden analizar de acuerdo con este método muestras con grandes concentraciones de cloruro o volúmenes de muestras más grandes siempre que se evite la acumulación de cloruro en el recipiente de oxidación. Posteriormente se puede determinar el carbono orgánico volátil, si procede, en función del tipo de muestra en cuestión.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ISO, Calidad del agua. Determinación del carbono orgánico total. Proyecto de norma internacional ISO/DIS 8245, 16 de enero de 1986.

(2) American Public Health Association, Standard Methods for the Estimation of Water and Wastewater. American Water Works Association y Water Pollution Control Federation, 16ª ed., 1985.

También de interés (presenta una descripción de un sistema de autoanálisis):

(3) Schreurs W. (1978). An automated colorimetric method for the determination of dissolved organic carbon in seawater by UV destruction. Hydrobiological Bulletin 12, pp. 137-142.

▼M6

*Apéndice 2*

**Biodegradación en agua de mar**

MÉTODO DEL FRASCO DE AGITACIÓN

FICHA DE DATOS

1. **LABORATORIO:**

2. **FECHA DE COMIENZO DEL ENSAYO:**

3. **SUSTANCIA PROBLEMA:**

Nombre:

| | | |
|---|---|---|
| Concentración de solución madre: | | mg/l como sustancia |
| Concentración inicial en el medio, $t_o$: | | mg/l como sustancia |
| | : | mg COD/l |

4. **AGUA DE MAR:**

Origen:

Fecha de recogida:

Profundidad a la que se ha tomado la muestra:

Aspecto en el momento de recogida (por ejemplo, turbia, etc.):

| | |
|---|---|
| Salinidad en el momento de recogida: | ‰ |
| Temperatura en el momento de recogida: | °C |
| COD «x» horas después de la recogida: | mg/l |

Tratamiento previo al ensayo (por ejemplo, filtración, sedimentación, envejecimiento, etc.):

| | | |
|---|---|---|
| Recuento de colonias microbianas | — muestra original: | colonias/ml |
| | — al iniciar el ensayo: | colonias/ml |

Otras características

5. **DETERMINACIONES DE CARBONO:**

Analizador de carbono:

| | Nº de frasco | | COD tras n días (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| Ensayo: agua de mar enriquecida con nutrientes con sustancia problema | 1 | $a_1$ | | | | | |
| | | $a_2$ | | | | | |
| | | media, $C_{a(t)}$ | | | | | |
| | 2 | $b_1$ | | | | | |
| | | $b_2$ | | | | | |
| | | media, $C_{b(t)}$ | | | | | |

▼**M6**

| | Nº de frasco | | COD tras n días (mg/l) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| En blanco: agua enriquecida con nutrientes sin sustancia problema | 1 | $c_1$ | | | | | |
| | | $c_2$ | | | | | |
| | | media, $C_{c(t)}$ | | | | | |
| | 2 | $d_1$ | | | | | |
| | | $d_2$ | | | | | |
| | | media, $C_{d(t)}$ | | | | | |
| | media, $C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$ | | | | | | |
| | | | | | | | |

6. **EVALUACIÓN DE LOS DATOS EN BRUTO:**

| Nº de frasco | Cálculo de los resultados | % de degradación tras n días | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | $n_1$ | $n_2$ | $n_3$ | $n_x$ |
| 1 | $D_1 = 1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$ | 0 | | | | |
| 2 | $D_2 = 1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \times 100$ | 0 | | | | |
| Media (*) | $D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$ | 0 | | | | |

(*) No se debe calcular el promedio de $D_1$ y $D_2$ si hay una diferencia considerable.

Nota: Se pueden utilizar formatos similares cuando la degradación vaya seguida de un análisis específico y para la sustancia de referencia y los controles de toxicidad.

7. **DEGRADACIÓN ABIÓTICA (opcional)**

| | Tiempo (días) | |
|---|---|---|
| | 0 | t |
| Conc. de COD (mg/l) en el control estéril | $C_{s(o)}$ | $C_{s(t)}$ |

$$\%degradación\ abiótica = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

▼**M6**

*Apéndice 3*

**Cálculo de la demanda bioquímica teórica y de oxígeno**

MÉTODO DEL FRASCO CERRADO

La DTO de la sustancia $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ de peso molecular PM se calcula con:

$$DTO_{NH3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{PM}$$

Este cálculo implica que C se mineraliza a $CO_2$, H a $H_2O$, P a $P_2O_5$, y Na a $Na_2O$. El halógeno se elimina como halogenuro de hidrógeno y el nitrógeno, como amoníaco.

Ejemplo:

Glucosa $C_6H_{12}O_6$, PM = 180

$$DTO = \frac{16\left(2 \times 6 + \frac{1}{2} \times 12 - 6\right)}{180} = 1{,}07 \ \ mg\ O_2/mg\ glucosa$$

Los pesos moleculares de las sales distintas a las de los metales alcalinos se calculan con arreglo al supuesto de que las sales se han hidrolizado.

Se supone que el azufre se oxida al estado + 6.

Ejemplo:

n-Dodecilbenceno-sulfonato de sodio $C_{18}H_{29}SO_3Na$, PM = 348

$$DTO = \frac{16\left(36 + \frac{29}{2} + 3 + \frac{1}{2} - 3\right)}{348} = 2{,}34 \ \ mg\ O_2/mg\ sustancia$$

En el caso de las sustancias que contienen nitrógeno, este puede eliminarse como amoníaco, nitrito o nitrato, con arreglo a las distintas demandas bioquímicas teóricas de oxígeno.

$$DTO_{NO2} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{3}{2^n} + \frac{5}{2_p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{PM}$$

$$DTO_{NO3} = \frac{16\left[2c + \frac{1}{2}(h - cl) + 3s + \frac{5}{2^n} + \frac{5}{2^p} + \frac{1}{2^{na}} - o\right]}{PM}$$

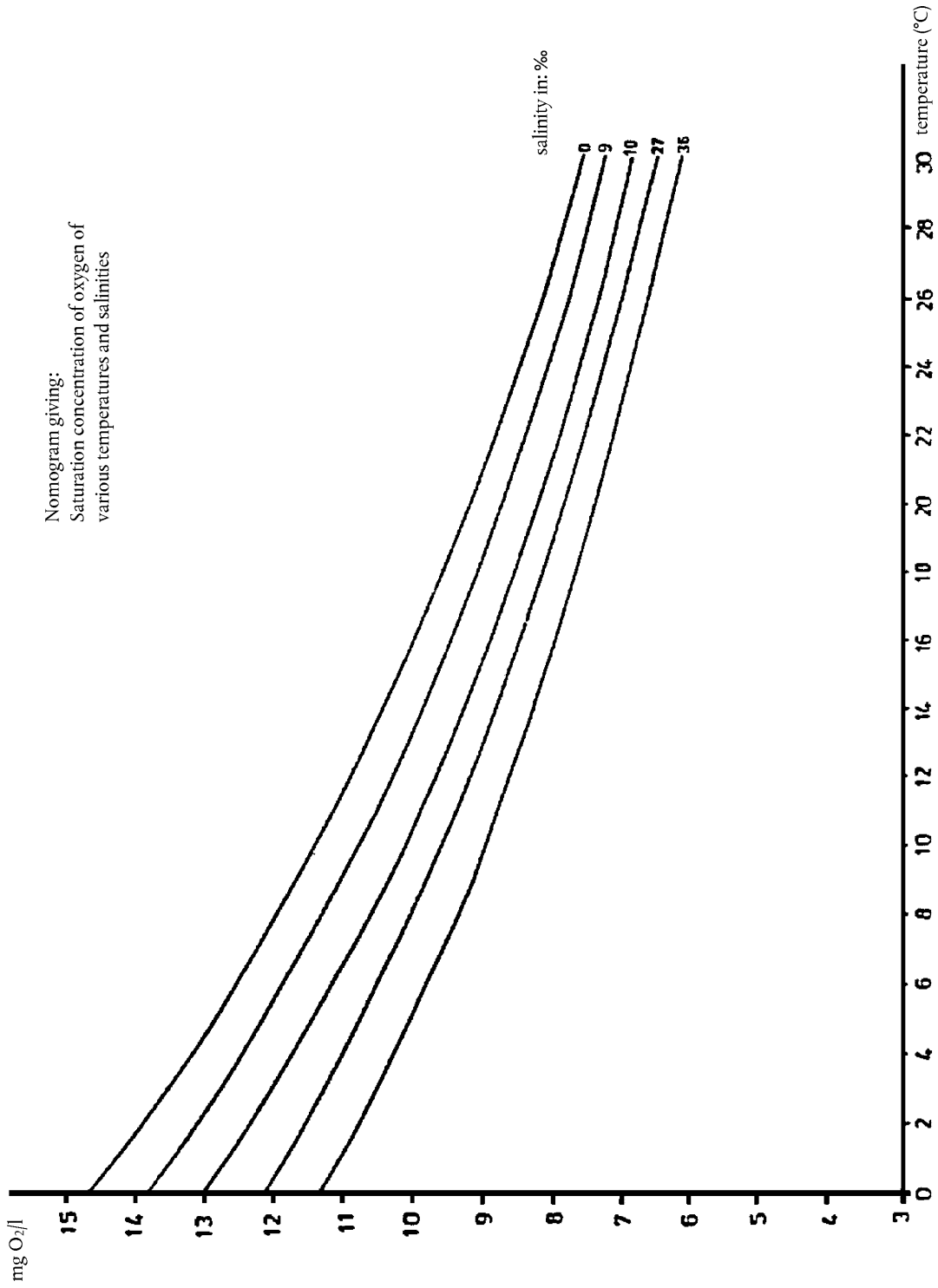
Supongamos que se ha observado la formación completa de nitrato mediante análisis en el caso de una amina secundaria:

$(C_{12}H_{25})_2$ NH, PM = 353

$$DTO_{NO3} = \frac{16\left(48 + \frac{51}{2} + \frac{5}{2}\right)}{353} = 3{,}44 \ \ mg\ O_2/mg\ sustancia$$

▼**M6**

*Apéndice 4*



▼M6

*Apéndice 5*

**Biodegradación en agua de mar**

MÉTODO DEL FRASCO CERRADO

FICHA DE DATOS

1. **LABORATORIO:**

2. **FECHA DE COMIENZO DEL ENSAYO:**

3. **SUSTANCIA PROBLEMA:**

Nombre:

| | |
|---|---|
| Concentración de solución madre: | mg/l |
| Conc. inicial en medio de agua de mar: | mg/l |
| DTO o DQO: | mg de $O_2$/mg de sustancia problema |

4. **AGUA DE MAR:**

Origen:

Fecha de recogida:

Profundidad a la que se ha tomado la muestra:

Aspecto en el momento de recogida (por ejemplo, turbia, etc.):

| | |
|---|---|
| Salinidad en el momento de recogida: | ‰ |
| Temperatura en el momento de recogida: | °C |
| COD «x» horas después de la recogida: | mg/l |

Tratamiento previo al ensayo (por ejemplo, filtración, sedimentación, envejecimiento, etc.):

| | | |
|---|---|---|
| Recuento de colonias microbianas | — muestra original: | colonias/ml |
| | — al iniciar el ensayo: | colonias/ml |

Otras características

5. **MEDIO DE ENSAYO:**

| | |
|---|---|
| Temperatura tras la aireación: | °C |
| Concentración de $O_2$ tras la aireación y que permanece antes del inicio del ensayo: | mg de $O_2$/l |

6. **DETERMINACIÓN DEL OD:**

Método: Winkler/electrodo

| | Nº de frasco | | mg de $O_2$/l después de n días | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | 5 | 15 | 28 |
| Ensayo: agua de mar enriquecida con nutrientes con sustancia problema | 1 | $a_1$ | | | | |
| | 2 | $a_2$ | | | | |
| | Media del ensayo | $m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$ | | | | |

▼M6

| | Nº de frasco | | mg de $O_2$/l después de n días | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 0 | 5 | 15 | 28 |
| Blanco: agua de mar enriquecida con nutrientes, sin sustancia problema | 1 | $c_1$ | | | | |
| | 2 | $c_2$ | | | | |
| | Media del blanco | $m_b = \frac{c_1 + c_2}{2}$ | | | | |

*Nota:* Pueden utilizarse formatos similares para las sustancias de referencia y los controles de toxicidad.

7. **REDUCCIÓN DEL OD: % DEGRADACIÓN (%D):**

| | Reducción del OD tras n días | | |
|---|---|---|---|
| | 5 | 15 | 28 |
| $(m_b - m_t)$ (1) | | | |
| $\%D = \frac{(m_b - m_t)(289)}{sustancia\ \ problema\ (mg/l) \times DTO} \times 100$ | | | |

(1) Se supone que $m_{b(o)} = m_{t(o)}$, donde
$m_{b(o)}$ = valor en blanco el día 0,
$m_{t(o)}$ = valor de la sustancia problema el día 0.
Si $m_{b(o)}$ no es igual a $m_{t(o)}$, se utiliza $(m_{t(o)} - m_{t(x)}) - (m_{b(o)} - m_{b(x)})$, donde
$m_{b(x)}$ = valor en blanco el día x,
$m_{t(x)}$ = valor de la sustancia problema el día x.

▼M6

## C.43. BIODEGRADABILIDAD ANAERÓBICA DE LAS SUSTANCIAS ORGÁNICAS EN LODO DIGERIDO: POR MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE GASES

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 311 de la OCDE (2006). Hay una serie de ensayos de cribado para evaluar la biodegradabilidad aeróbica de las sustancias orgánicas [métodos de ensayo C.4, C.9, C.10 y C.11 (1) y TG 302C de la OCDE (2)], y los resultados de la aplicación de estos métodos se han utilizado con buenos resultados para predecir el destino de las sustancias en el entorno aeróbico, en particular en las fases aeróbicas del tratamiento de las aguas residuales. Hay diversas proporciones de sustancias insolubles en agua, así como de sustancias que se adsorben sobre sólidos de las aguas residuales, que también se tratan aeróbicamente, ya que están presentes en las aguas residuales sedimentadas. Sin embargo, las grandes fracciones de estas sustancias están fijadas a los lodos sedimentados primarios, que se separan de las aguas residuales sin tratar, en depósitos de sedimentación, antes de tratar aeróbicamente las aguas residuales sedimentadas, o los sobrenadantes. El lodo, que contiene algunas de las sustancias solubles en el líquido intersticial, pasa a continuación a digestores calentados para su tratamiento anaeróbico. Hasta ahora no había ensayos en esta serie para evaluar la biodegradabilidad anaeróbica en los digestores anaeróbicos, y el presente ensayo va dirigido a cubrir esa laguna; no es aplicable necesariamente a otros compartimentos ambientales anóxicos.

2. Se han utilizado para evaluar la biodegradabilidad anaeróbica, con buenos resultados, técnicas respirométricas que miden las cantidades de gas producidas, principalmente metano ($CH_4$) y dióxido de carbono ($CO_2$), en condiciones anaeróbicas. Birch et al. (3) revisaron estos procedimientos y concluyeron que el trabajo de Shelton y Tiedje (4), basado en estudios anteriores (5) (6) (7), era el más exhaustivo. El método (4), que otros (8) siguieron desarrollando y se ha convertido en la norma en Estados Unidos (9) (10), no resolvía los problemas relacionados con las distintas solubilidades del $CO_2$ y $CH_4$ en el medio del ensayo ni con el cálculo de la producción teórica de gas de una sustancia problema. El informe ECETOC (3) recomendaba la medición adicional del contenido en carbono inorgánico disuelto (CID) del líquido sobrenadante, lo que hacía que la técnica pudiera aplicarse de forma más general. El método ECETOC se sometió a un ejercicio de calibración internacional (o ensayo interlaboratorios) y se convirtió en la norma ISO 11734 (11).

3. Este método de ensayo, basado en la norma ISO 11734 (11), describe un método de cribado para evaluar la potencial biodegradabilidad anaeróbica de las sustancias orgánicas en una situación concreta (es decir, en un digestor anaeróbico, en un momento y dentro de un intervalo de concentración de microorganismos determinados). Como se utiliza un lodo diluido con una concentración relativamente alta de la sustancia problema y la duración del ensayo suele ser superior al tiempo de retención en los digestores anaeróbicos, las condiciones del ensayo no se corresponden exactamente con las condiciones en los digestores anaeróbicos, ni resultan aplicables para evaluar la biodegradabilidad anaeróbica de las sustancias orgánicas en unas condiciones ambientales distintas. El lodo se expone a la sustancia problema durante un periodo máximo de 60 días, que es un periodo superior al tiempo de retención normal del lodo (de 25 a 30 días) en los digestores anaeróbicos, aunque en las instalaciones industriales los tiempos de retención pueden ser mucho más largos. Las previsiones basadas en los resultados de este ensayo no son tan seguras como en el caso de la biodegradación aeróbica, ya que las pruebas acumuladas sobre el comportamiento de las sustancias problema en los ensayos aeróbicos «fáciles» y en los ensayos de simulación y el entorno aeróbico son suficientes para asegurar que existe una relación; en lo que respecta al entorno anaeróbico hay muy pocas pruebas similares. Se puede suponer que la biodegradación anaeróbica completa se produce si se logra entre el 75 y el 80 % de la producción de gas teórica. Las grandes proporciones de sustancia con respecto a la biomasa que se utilizan en estos ensayos implican que una sustancia que supera las pruebas presenta una mayor probabilidad de degradación en un digestor anaeróbico. Por otra parte, es posible que las

▼M6

sustancias que no consiguen convertirse en gas durante el ensayo no persistan necesariamente con unas proporciones de sustancia-biomasa más realistas ambientalmente. Asimismo, se producen otras reacciones anaeróbicas por las que las sustancias pueden degradarse, al menos parcialmente, por ejemplo mediante decloración, pero este ensayo no detecta dichas reacciones. No obstante, al aplicar métodos analíticos específicos para determinar la sustancia problema, se puede seguir su desaparición (véanse los puntos 6, 30, 44 y 53). PRINCIPIO DEL ENSAYO

4. El lodo digerido lavado ([1]), que contiene concentraciones bajas (< 10 mg/l) de carbono inorgánico (CI), se diluye unas diez veces hasta lograr una concentración de sólidos total de 1 a 3 g/l, y se incuba a 35 °C ± 2 °C en recipientes sellados con la sustancia problema a 20-100 mg C/l, durante 60 días como máximo. Se mide la actividad del lodo llevando a cabo controles en blanco paralelos con inóculo de lodo en el medio, pero sin la sustancia problema.

5. Se mide el aumento de la presión de los espacios libres de los recipientes, resultante de la producción de dióxido de carbono y metano. Gran parte del $CO_2$ producido se disolverá en la fase líquida o se transformará en carbonato o carbonato de hidrógeno en las condiciones del ensayo. Este carbono inorgánico se mide al final del ensayo.

6. La cantidad de carbono (inorgánico más metano) resultante de la biodegradación de la sustancia problema se calcula a partir de la producción de gas neta y de la formación de CI neta en la fase líquida que excedan de los valores del control en blanco. El grado de biodegradación se calcula a partir del CI total y del C metánico producidos, en forma de porcentaje de la cantidad medida o calculada del carbono que se añade como sustancia problema. El proceso de biodegradación puede seguirse realizando mediciones intermedias solamente de la producción de gas. Además, se puede determinar la biodegradación primaria mediante análisis específicos al principio y al final del ensayo.

INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

7. Es necesario conocer las características de pureza, hidrosolubilidad, volatilidad y adsorción de la sustancia problema para poder interpretar correctamente los resultados. El contenido de carbono orgánico (% p/p) de la sustancia problema debe conocerse a partir de su estructura química o por medición. En lo que respecta a las sustancias problema volátiles, conocer la constante de la ley de Henry, por medición o por cálculo, resulta útil para decidir si el ensayo es aplicable o no. También es conveniente disponer de información sobre la toxicidad de la sustancia problema para las bacterias anaeróbicas a la hora de seleccionar una concentración de ensayo adecuada y para interpretar los resultados que indiquen una escasa biodegradabilidad. Se recomienda incluir un control de la inhibición salvo que se sepa que la sustancia problema no es inhibidora de la actividad microbiana anaeróbica [véanse el punto 21 y la norma ISO 13641-1 (12)].

([1]) El lodo digerido es una mezcla de las fases sedimentadas de las aguas residuales y del lodo activado, que se han incubado en un digestor anaeróbico a unos 35 °C para reducir la biomasa y los problemas de olor, así como para mejorar la capacidad de deshidratación del lodo. Consiste en una asociación de bacterias anaeróbicas fermentativas y metanogénicas que producen dióxido de carbono y metano (11).

▼M6

APLICABILIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO

8. El método de ensayo puede aplicarse a sustancias hidrosolubles; también puede aplicarse a sustancias poco solubles e insolubles, siempre que se utilice un método de dosificación exacta; por ejemplo, véase la norma ISO 10634 (13). En general, la decisión se ha de tomar caso por caso en lo que respecta a las sustancias volátiles. Es posible que haya que aplicar medidas especiales como, por ejemplo, impedir la liberación de gas durante el ensayo.

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

9. Para comprobar el procedimiento, se realiza un ensayo con una sustancia de referencia preparando recipientes adecuados en paralelo como parte de las series normales del ensayo. El fenol, el benzoato sódico y el polietilenglicol 400 son algunos ejemplos y cabría esperar que se degraden en más de un 60 % de la producción de gas teórica (es decir, metano y carbono inorgánico) en un plazo de 60 días (3) (14).

REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

10. En un ensayo interlaboratorios internacional (14) se logró una buena reproducibilidad en las mediciones de la presión de gas entre recipientes triplicados. La desviación típica relativa (coeficiente de variación, COV) se encontraba generalmente por debajo del 20 %, aunque este valor aumentaba con frecuencia a más del 20 % en presencia de sustancias tóxicas o cerca del final del periodo de incubación de 60 días. En los recipientes de volumen inferior a 150 ml también se encontraron desviaciones mayores. Los valores finales de pH de los medios del ensayo se encontraban dentro del intervalo de 6,5 a 7,0.

11. En el ensayo interlaboratorios se obtuvieron los resultados siguientes.

| Sustancia problema | Datos totales $n_1$ | Degradación media (de los datos totales) (%) | Desviación típica relativa (de los datos totales) (%) | Datos válidos $n_2$ | Degradación media (de los datos válidos) (%) | Desviación típica relativa (de los datos válidos) (%) | Datos > 60 % de degradación en los ensayos válidos $n_3$ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Ácido palmítico | 36 | 68,7 ± 30,7 | 45 | 27 | 72,2 + 18,8 | 26 | 19 = 70 % (*) |
| Polietilenglicol 400 | 38 | 79,8 ± 28,0 | 35 | 29 | 77,7 + 17,8 | 23 | 24 = 83 % (*) |

(*) Proporción de $n_2$

12. Los coeficientes de variación de la media de todos los valores obtenidos con el ácido palmítico y el polietilenglicol 400 ascendieron al 45 % (n = 36) y al 35 % (n = 38), respectivamente. Cuando los valores inferiores al 40 % y superiores al 100 % se omitieron (se supuso que los primeros se debían a condiciones subóptimas y los segundos, a razones desconocidas), los COV se redujeron al 26 % y al 23 %, respectivamente. Las proporciones de valores «válidos» que lograron al menos una degradación del 60 % fueron un 70 % para el ácido palmítico y un 83 % para el polietilenglicol 400. Las proporciones de la biodegradación porcentual derivadas de las mediciones de CID fueron relativamente bajas, pero variables. En lo que respecta al ácido palmítico, el intervalo fue del 0 al 35 %, con una media del 12 % y un COV del 92 %; para el polietilenglicol 400, el intervalo osciló entre el 0 y el 40 %, con una media del 24 % y un COV del 54 %.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

**Equipo**

13. Se requieren un equipo de laboratorio habitual y los elementos siguientes:

a. Incubadora a prueba de chispas y controlada a 35 °C ± 2 °C.

▼M6

b. Recipientes de ensayo de vidrio resistente a la presión, de un tamaño nominal adecuado ([1]), cada uno de ellos con un tapón estanco a los gases capaz de resistir 2 bar aproximadamente. El volumen de espacio libre debe ser aproximadamente del 10 al 30 % del volumen total. Si se libera biogás regularmente, un volumen de espacio libre en torno al 10 % resulta apropiado, pero si la liberación de gas se realiza solo al final del ensayo, resulta apropiado un 30 %. Se recomienda usar frascos de suero de vidrio con un volumen nominal de 125 ml y un volumen total aproximado de 160 ml, sellados con un tapón de frascos de suero ([2]) y con cápsulas de aluminio, cuando se libera presión cada vez que se realiza el muestreo;

c. Dispositivo ([3]) para medir la presión, adaptado para permitir la medición y la evacuación del gas producido; por ejemplo, un manómetro manual preciso y conectado a una aguja de jeringa adecuada; una válvula de tres vías estanca a los gases facilita la liberación del exceso de presión (apéndice 1). Esto es necesario para mantener el volumen interno de los tubos del transductor de presión y de la válvula lo más bajo posible, de forma que los errores introducidos al ignorar el volumen del equipo resulten insignificantes.

Nota: Las lecturas de presión se utilizan directamente para calcular la cantidad de carbono producido en el espacio libre (puntos 42 a 44). Por otra parte, las lecturas de presión pueden convertirse en volúmenes (a 35 °C, presión atmosférica) del gas producido mediante un gráfico de conversión. Este gráfico se elabora a partir de los datos obtenidos inyectando volúmenes conocidos de gas nitrógeno en una serie de recipientes de ensayo (por ejemplo, frascos de suero) a 35° +/- 2 °C y registrando las lecturas resultantes de la presión estabilizada (véase el apéndice 2). El cálculo se incluye en la nota del punto 44.

Advertencia: Se debe proceder con cuidado para evitar lesiones producidas con agujas cuando se utilicen microjeringas.

d. Analizador de carbono, adecuado para calcular directamente el carbono inorgánico en un intervalo de 1 a 200 mg/l.

e. Jeringas de alta precisión para tomar muestras gaseosas y líquidas.

f. Agitadores magnéticos y sus barritas (opcional).

g. Caja de guantes (recomendado).

**Reactivos**

14. Deben utilizarse siempre reactivos de pureza analítica.

([1]) El tamaño recomendado es de 0,1 a 1 litro.

([2]) Se recomienda usar tapones de silicona estancos a los gases. Por otra parte, se recomienda comprobar la estanqueidad de los tapones, en particular de los de goma de butilo, ya que hay varios tapones disponibles en el mercado que no presentan una estanqueidad suficiente para el metano, y algunos tapones no se mantienen estancos cuando se perforan con una aguja en las condiciones del ensayo.

([3]) El dispositivo debe utilizarse y calibrarse a intervalos regulares, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se utiliza un manómetro de la calidad indicada, por ejemplo encapsulado con una membrana de acero, no será necesario realizar calibraciones en el laboratorio. La exactitud de la calibración se puede comprobar en el laboratorio con una medición de un punto a $1 \times 10^5$ Pa, con un manómetro con indicador mecánico. Cuando este punto se mide correctamente, la linealidad no variará. Si se utilizan otros dispositivos de medición (sin calibración certificada por el fabricante), se recomienda llevar a cabo la calibración periódicamente en todo el intervalo.

▼M6

**Agua**

15. Agua destilada o desionizada (desoxigenada mediante corriente de gas nitrógeno con menos de 5 µl/l de oxígeno) que contenga menos de 2 mg/l de carbono orgánico disuelto (COD).

**Medio de ensayo**

16. El medio de dilución se prepara para contener los componentes siguientes en las cantidades indicadas:

| | |
|---|---|
| Fosfato potásico de dihidrógeno anhidro ($KH_2PO_4$) | 0,27 g |
| Fosfato disódico de hidrogeno dodecahidratado ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) | 1,12 g |
| Cloruro de amonio ($NH_4Cl$) | 0,53 g |
| Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) | 0,075g |
| Cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) | 0,10 g |
| Cloruro de hierro (II) tetrahidratado ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) | 0,02 g |
| Resazurina (indicador de oxígeno) | 0,001g |
| Sulfuro sódico nonahidratado ($Na_2S \cdot 9H_2O$) | 0,10 g |
| Solución madre de oligoelementos (opcional, punto 18) | 10 ml |
| Añadir agua desoxigenada (punto 15) | Hasta 1 litro |

*Nota:* Debe utilizarse sulfuro sódico recién suministrado o debe lavarse y secarse antes de usarlo para garantizar suficiente capacidad reductora. El ensayo puede realizarse sin utilizar una caja de guantes (véase el punto 26). En ese caso, la concentración final de sulfuro sódico en el medio debe aumentarse a 0,20 g de $Na_2S \times 9H_2O$ por litro. El sulfuro sódico también puede añadirse de una solución madre anaeróbica adecuada a través del tapón de los recipientes de ensayo cerrados, ya que este procedimiento reducirá el riesgo de oxidación. El sulfuro sódico puede reemplazarse con citrato de titanio (III), que se añade a través del tapón de los recipientes de ensayo cerrados con una concentración final de 0,8 a 1,0 mmol/l. El citrato de titanio (III) es un agente reductor muy eficaz y de baja toxicidad, que se prepara de la forma siguiente: disuelva 2,94 g de citrato trisódico dihidratado en 50 ml de agua desoxigenada (para producir una solución de 200 mmol/l) y añada 5 ml de una solución de cloruro de titanio (III) al 15 % (p/v). Neutralice a pH 7 ± 0,2 con álcalis minerales y póngalo en un recipiente adecuado en corriente de nitrógeno. La concentración de citrato de titanio (III) de esta solución madre es de 164 mmol/l.

17. Mezcle los componentes del medio de ensayo, excepto el agente reductor (sulfuro sódico, citrato de titanio) y pase por la solución una corriente de gas nitrógeno durante unos 20 minutos, justo antes de usarla, para eliminar el oxígeno. A continuación, añada el volumen adecuado de la solución recién preparada del agente reductor (preparada en agua desoxigenada), justo antes de usar el medio. Ajuste el pH del medio, en caso necesario, con ácido mineral o álcali diluido a 7 ± 0,2.

▼M6

**Solución madre de oligoelementos (opcional)**

18. Se recomienda que el medio de ensayo contenga los siguientes oligoelementos para mejorar los procesos de degradación anaeróbicos, especialmente si se utilizan bajas concentraciones (por ejemplo, 1 g/l) de inóculo (11).

| | |
|---|---|
| Cloruro de manganeso tetrahidratado ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) | 50 mg |
| Ácido bórico ($H_3BO_3$) | 5 mg |
| Cloruro de cinc ($ZnCl_2$) | 5 mg |
| Cloruro de cobre (II) ($CuCl_2$) | 3 mg |
| Molibdato disódico dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) | 1 mg |
| Cloruro de cobalto hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) | 100 mg |
| Cloruro de níquel hexahidratado ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) | 10 mg |
| Selenito disódico ($Na_2SeO_3$) | 5 mg |
| Añadir agua desoxigenada (punto 15) | Hasta 1 litro |

**Sustancia problema**

19. Añada la sustancia problema como solución madre, suspensión, emulsión o directamente como sólido o líquido, o absorbido en un filtro de fibra de vidrio para conseguir una concentración no superior a 100 mg/l de carbono orgánico. Si se utilizan soluciones madre, preparar una solución adecuada con agua (punto 15) (previamente desoxigenada mediante corriente de gas nitrógeno), de una fuerza tal que el volumen añadido sea inferior al 5 % del volumen total de la mezcla de reacción. Ajuste el pH de la solución madre a un pH de 7 ± 0,2 en caso necesario. En lo que respecta a las sustancias insuficientemente solubles en agua, se debe consultar la norma ISO 10634 (13). Si se utiliza un disolvente, prepare un control adicional con solamente el disolvente añadido al medio inoculado. Deben evitarse los disolventes orgánicos conocidos por inhibir la producción de metano, tales como el cloroformo y el tetracloruro de carbono.

Advertencia: Las sustancias problema tóxicas deben manipularse con cuidado, así como aquellas sustancias cuyas propiedades no se conozcan.

**Sustancias de referencia**

20. Se han utilizado con buenos resultados para comprobar el procedimiento sustancias de referencia como el benzoato sódico, el fenol y el polietilenglicol 400, con una biodegradación superior al 60 % en 60 días. Prepare una solución madre (en agua desoxigenada) de la sustancia de referencia seleccionada, de la misma forma que con la sustancia problema, y ajuste el pH a 7 ± 0,2 en caso necesario.

**Control de inhibición (condicional)**

21. Con el fin de obtener información sobre la toxicidad de la sustancia problema para los microorganismos anaeróbicos y averiguar cuál es la concentración de ensayo más adecuada, añada la sustancia problema y la sustancia de referencia a un recipiente que contenga el medio de ensayo (véase el punto 16), cada una con las mismas concentraciones añadidas, respectivamente [véanse los puntos 19 y 20 y la norma ISO 13641-1 (12)].

▼M6

**Lodo digerido**

22. Recoja el lodo digerido de un digestor de una planta de tratamiento de aguas residuales que procese sobre todo aguas domésticas. El lodo debe caracterizarse completamente y debe incluirse su información de referencia (véase el punto 54). Si se ha previsto utilizar un inóculo adaptado, puede plantearse el uso de un lodo digerido de una planta de tratamiento de aguas residuales industriales. Utilice frascos de cuello ancho hechos de polietileno de alta densidad o de un material similar, que se pueda expandir, para recoger el lodo digerido. Añada lodo hasta que quede a 1 cm aproximadamente de la parte superior de los frascos y selle herméticamente, preferiblemente con una válvula de seguridad. Tras su transporte al laboratorio, el lodo recogido puede utilizarse directamente o colocarse en un digestor a escala de laboratorio. Libere el exceso de biogás abriendo con cuidado los frascos de lodo. También se puede utilizar lodo anaeróbico producido en laboratorio como fuente de inóculo, pero es posible que su espectro de actividad se haya visto afectado.

Advertencia: El lodo digerido produce gases inflamables que presentan riesgos de incendio y explosión. También contiene organismos potencialmente patógenos; por lo tanto, se deben tomar las precauciones adecuadas a la hora de manipular el lodo. Por motivos de seguridad, no se deben utilizar recipientes de vidrio para recoger lodo.

23. Para reducir la producción de gas de fondo y reducir la influencia de los controles en blanco, se puede plantear la digestión previa del lodo. Si se requiere la digestión previa, se debe permitir la digestión del lodo sin añadir nutrientes ni sustratos, a 35 °C ± 2 °C durante 7 días como máximo. Se ha establecido que una digestión previa durante unos cinco días suele provocar una reducción óptima de la producción de gas del blanco sin aumentos inaceptables en los periodos de latencia o de incubación durante la fase del ensayo, ni tampoco pérdida de actividad con respecto a un pequeño número de sustancias evaluadas.

24. En lo que respecta a las sustancias problema que sean, o se espere que sean, poco biodegradables, se puede contemplar la posibilidad de una exposición previa del lodo a la sustancia problema para obtener un inóculo mejor adaptado. En tal caso, añada la sustancia problema con una concentración de carbono orgánico de 5 a 20 mg/l al lodo digerido e incube durante dos semanas como máximo. Lave con cuidado el lodo previamente expuesto antes de usarlo (véase el punto 25) e indique en el informe del ensayo las condiciones de la exposición previa.

**Inóculo**

25. Lave el lodo (véanse los puntos 22 a 24) justo antes de usarlo para reducir la concentración de CI a menos de 10 mg/l en la suspensión final del ensayo. Centrifugue el lodo en tubos herméticos (por ejemplo, 3 000 g durante cinco minutos) y deseche el sobrenadante. Suspenda el precipitado resultante en un medio desoxigenado (puntos 16 y 17), vuelva a centrifugar la suspensión y deseche el líquido sobrenadante. Si el CI no se hubiera reducido lo suficiente, el procedimiento de lavado del lodo puede repetirse dos veces como máximo. Esto no parece afectar negativamente a los microorganismos. Por último, suspenda el precipitado en el volumen necesario de medio de ensayo y determine la concentración de sólidos totales [por ejemplo, ISO 11923 (15)]. La concentración final de sólidos totales en los recipientes de ensayo debe encontrarse dentro de un intervalo de 1 a 3 g/l (o aproximadamente el 10 % de la concentración del lodo digerido no diluido). Las operaciones anteriores deben realizarse de tal manera que el lodo tenga el mínimo contacto con el oxígeno (por ejemplo, utilizando una atmósfera de nitrógeno).

▼M6

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

26. Realice los procedimientos iniciales siguientes con técnicas que mantengan el mínimo contacto posible entre el lodo digerido y el oxígeno; por ejemplo, puede que sea necesario trabajar con una caja de guantes en una atmósfera de nitrógeno o purgar los frascos con nitrógeno (4).

**Preparación de los recipientes de ensayo y de control**

27. Prepare recipientes de ensayo como mínimo triplicados (véase el punto 13-b) para la sustancia problema, los controles en blanco, la sustancia de referencia, los controles de inhibición (condicionales) y las cámaras de control de presión (procedimiento opcional) (véanse los puntos 7 y 19 a 21). Asimismo, pueden prepararse más recipientes con el fin de evaluar la biodegradación primaria mediante análisis específicos de la sustancia problema. Se puede utilizar el mismo conjunto de controles en blanco con varias sustancias problema en el mismo ensayo, siempre que los volúmenes de los espacios libres sean homogéneos.

28. Prepare el inóculo diluido antes de añadirlo a los recipientes, por ejemplo, con una pipeta de boca ancha. Añada partes alícuotas de un inóculo bien mezclado (punto 25), de forma que la concentración de sólidos totales sea la misma en todos los recipientes (entre 1 y 3 g/l). Añada las soluciones madre de la sustancia problema y de la de referencia tras ajustar el pH a 7 ± 0,2, en caso necesario. La sustancia problema y la sustancia de referencia deben añadirse utilizando la vía de administración más apropiada (punto 19).

29. La concentración de ensayo de carbono orgánico debe encontrarse, normalmente, entre los 20 y los 100 mg/l (punto 4). Si la sustancia problema es tóxica, la concentración de ensayo debe reducirse a 20 mg C/l, o incluso a menos si solo fuera a medirse la biodegradación primaria con análisis específicos. Cabe señalar que la variabilidad de los resultados del ensayo aumenta a concentraciones de ensayo inferiores.

30. En lo que respecta a los recipientes en blanco, añada una cantidad equivalente del vehículo utilizado para aportar la sustancia problema en lugar de una solución madre, suspensión o emulsión. Si la sustancia problema se ha administrado con filtros de fibra de vidrio o disolventes orgánicos, añada a los blancos un filtro o un disolvente de volumen equivalente que se haya evaporado. Prepare una réplica extra con la sustancia problema para medir el valor del pH. Ajuste el pH a 7 ± 0,2, en caso necesario, con pequeñas cantidades de ácido mineral o álcali diluido. Se deben añadir las mismas cantidades de agentes neutralizadores a todos los recipientes de ensayo. Estas adiciones no deberían tener que hacerse, porque ya se ha ajustado el valor del pH de las soluciones madre de la sustancia problema y la sustancia de referencia (véanse los puntos 19 y 20). Si va a medirse la biodegradación primaria, debe tomarse una muestra adecuada del recipiente de control de pH, o de un recipiente de ensayo adicional, y la concentración de la sustancia problema debe medirse con análisis específicos. Se pueden añadir imanes cubiertos a todos los recipientes si van a agitarse las mezclas de reacción (opcional).

31. Hay que asegurarse de que el volumen total de líquido $V_l$ y el volumen de espacio libre $V_h$ sean iguales en todos los recipientes; se deben anotar y registrar los valores de $V_l$ y $V_h$. Cada recipiente debe sellarse con un tapón para gases y transferirse desde la caja de guantes (véase el punto 26) a la incubadora (véase el punto 13-a).

▼M6

**Sustancias problema insolubles**

32. Añada directamente a los recipientes preparados cantidades pesadas de las sustancias que sean poco solubles en el agua. Cuando sea necesario utilizar un disolvente (véase el punto 19), transfiera la solución o la suspensión de la sustancia problema a los recipientes vacíos. En la medida de lo posible, evapore el disolvente pasando gas nitrógeno por los recipientes y, a continuación, añada el resto de ingredientes, a saber, el lodo diluido (punto 25) y el agua desoxigenada, según resulte necesario. También debe prepararse un control de disolvente adicional (véase el punto 19). En lo que respecta a otros métodos de adición de sustancias insolubles, se puede consultar la norma ISO 10634 (13). Las sustancias problema líquidas pueden introducirse con una jeringa en los recipientes herméticos completamente preparados, si se prevé que el pH inicial no supere 7 ± 1; de lo contrario, introdúzcalas de la manera descrita anteriormente (véase el punto 19).

**Incubación y mediciones de la presión de gas**

33. Incube los recipientes preparados a 35 °C ± 2 °C durante una hora aproximadamente, para permitir el equilibrado y eliminar el gas sobrante a la atmósfera, por ejemplo agitando cada recipiente, introduciendo la aguja del manómetro (punto 13-c) a través del cierre hermético y abriendo la válvula hasta que el manómetro marque cero. Si en esta fase, o cuando se realicen mediciones intermedias, la presión del espacio libre es inferior a la atmosférica, deberá introducirse gas nitrógeno para restablecer la presión atmosférica. Cierre la válvula (véase el punto 13-c) y continúe incubando en la oscuridad, asegurándose de que todas las partes de los recipientes se mantengan a la temperatura de digestión. Observe los recipientes después de incubar durante un periodo de 24 a 48 horas. Rechace los recipientes si su contenido presenta un claro color rosa en el líquido sobrenadante, es decir, si la resazurina (véase el punto 16) ha cambiado de color, lo que indica la presencia de oxígeno (véase el punto 50). Aunque el sistema puede tolerar pequeñas cantidades de oxígeno, las concentraciones más altas pueden inhibir gravemente el curso de la biodegradación anaeróbica. El rechazo de un solo recipiente individual de un conjunto de triplicados puede aceptarse, pero la incidencia de otros fallos aparte de este debe conllevar una investigación de los procedimientos experimentales, así como la repetición del ensayo.

34. Mezcle con cuidado el contenido de cada recipiente, removiendo o agitando durante unos minutos al menos dos o tres veces a la semana, y poco antes de cada medición de presión. La agitación vuelve a poner en suspensión el inóculo y garantiza el equilibrio gaseoso. Todas las mediciones de presión deben realizarse rápidamente, ya que los recipientes de ensayo pueden estar sujetos a una disminución de la temperatura, lo que puede provocar lecturas falsas. Mientras se mide la presión, todo el recipiente de ensayo, incluido el espacio libre, debe mantenerse a la temperatura de digestión. Mida la presión de gas, por ejemplo, introduciendo a través del tapón la aguja de la jeringa (punto 13-c) conectada al manómetro. Se debe tener cuidado para evitar la entrada de agua en la aguja de la jeringa; si esto ocurre, habrá que secar las partes húmedas y colocar una nueva aguja. La presión debe medirse en milibares (véase el punto 42). La presión del gas en los recipientes puede medirse periódicamente (por ejemplo, cada semana) y, opcionalmente, liberar el gas sobrante a la atmósfera. Por otro lado, la presión se puede medir únicamente al final del ensayo para determinar la cantidad de biogás producido.

35. Se recomienda realizar lecturas intermedias de la presión de gas, ya que un aumento de presión ofrece orientación sobre el momento en que se puede finalizar el ensayo y permite seguir la cinética (véase el punto 6).

▼M6

36. Normalmente, el ensayo finaliza tras un periodo de incubación de 60 días, a menos que la curva de biodegradación obtenida de las mediciones de presión haya alcanzado antes de ese momento la fase de meseta; esta fase es aquella en la que se alcanza la degradación máxima y la curva de biodegradación se estabiliza. Si el valor de meseta es inferior al 60 %, la interpretación resulta problemática, porque indica que solo se ha mineralizado parte de la molécula o que se ha cometido un error. Si al final del periodo de incubación normal se está produciendo gas, pero es obvio que no se ha alcanzado una fase de meseta, se debe plantear una prolongación del ensayo para comprobar si se alcanzará o no dicha meseta (más del 60 %).

**Medición del carbono inorgánico**

37. Al final del ensayo, tras la última medición de la presión de gas, hay que dejar que el lodo sedimente. Abra cada recipiente, por turnos, e inmediatamente tome una muestra para determinar la concentración (mg/l) de carbono inorgánico (CI) en el líquido sobrenadante. No debe aplicarse centrifugación ni filtración al líquido sobrenadante, ya que se produciría una pérdida inaceptable de dióxido de carbono disuelto. Si el líquido no pudiera analizarse al tomar la muestra, se debe conservar en un frasco sellado, sin espacio libre, y se debe refrigerar a unos 4 °C durante dos días como máximo. Después de la medición del CI, mida y registre el valor de pH.

38. Otra posibilidad es, determinar indirectamente el CI del sobrenadante mediante la liberación del CI disuelto como dióxido de carbono que puede medirse en el espacio libre. Después de la última medición de la presión de gas, ajuste la presión de cada uno de los recipientes de ensayo a la presión atmosférica. Acidifique el contenido de cada recipiente a aproximadamente un pH de 1, añadiendo ácido mineral concentrado (por ejemplo, $H_2SO_4$) a través del tapón de los recipientes sellados. Incube los recipientes agitados a 35 °C ± 2 °C durante 24 horas aproximadamente y mida con el manómetro la presión de gas resultante del dióxido de carbono desprendido.

39. Lleve a cabo lecturas similares del blanco correspondiente, la sustancia de referencia y, si se hubieran incluido, los recipientes de control de inhibición (véase el punto 21).

40. En algunos casos, en particular si se utilizan los mismos recipientes de control con varias sustancias problema, se debe plantear la posibilidad de realizar mediciones de las concentraciones intermedias de CI en los recipientes de ensayo y de control, si procede. En este caso, se debe preparar un número suficiente de recipientes para realizar todas las mediciones intermedias. Se prefiere este procedimiento a recoger todas las muestras de un mismo recipiente. Esta última opción solo puede realizarse si el volumen necesario para el análisis del CID no se considera demasiado alto. La medición del CID debe realizarse después de medir la presión de gas sin liberar el gas sobrante, como se describe a continuación:

— tome el volumen más pequeño posible de las muestras de sobrenadante con una jeringa, a través del tapón, sin abrir los recipientes, y determine el CI de la muestra;

— después de tomar la muestra, libere o no el gas sobrante;

— hay que tener en cuenta que incluso una pequeña disminución del volumen del sobrenadante (por ejemplo, del 1 %) puede provocar un aumento significativo del volumen del gas en el espacio libre ($V_h$);

— las ecuaciones (véase el punto 44) se corrigen aumentando el $V_h$ en la ecuación 3, en caso necesario.

▼M6

**Análisis específicos**

41. Si hay que calcular la degradación anaeróbica primaria (véase el punto 30), tome un volumen apropiado de la muestra para análisis específicos al principio y al final del ensayo de los recipientes que contienen la sustancia problema. Si se lleva a cabo esto, hay que tener en cuenta que los volúmenes del espacio libre ($V_h$) y del líquido ($V_l$) variarán; esto debe tenerse en cuenta a la hora de calcular los resultados de la producción de gas. También se pueden tomar muestras para realizar análisis específicos de las mezclas adicionales preparadas previamente con ese fin (punto 30).

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

42. Por razones prácticas, la presión del gas se mide en milibares (1 mbar = 1h Pa = $10^5$ Pa; 1 Pa = 1 N/$m^2$), el volumen en litros y la temperatura en grados Celsius.

**Carbono en el espacio libre**

43. Como 1 mol de metano y 1 mol de dióxido de carbono contienen, cada uno, 12 g de carbono, la masa de carbono de un volumen determinado de gas emitido puede expresarse de la siguiente forma:

$$m = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ecuación [1]}$$

donde:

m = masa de carbono (mg) en un volumen determinado de gas emitido;

12 = masa atómica relativa del carbono;

n = número de moles de gas en el volumen determinado.

Si se genera en grandes cantidades un gas distinto al metano o al dióxido de carbono (por ejemplo, $N_2O$), la fórmula [1] debe modificarse para describir la posibilidad de los efectos de los gases generados.

44. De acuerdo con las leyes de los gases, *n* puede expresarse de la siguiente forma:

$$n = \frac{pV}{RT} \quad \text{Ecuación [2]}$$

donde:

p = presión del gas (Pascales);

V = volumen del gas ($m^3$);

R = constante molar de los gases [8,314 J/(mol K)];

T = temperatura de incubación (grados Kelvin).

Mediante la combinación de las ecuaciones [1] y [2] y su racionalización para tener en cuenta la producción de gas del control en blanco:

$$m_h = \frac{12\,000 \times 0{,}1(\Delta p \cdot V_h)}{RT} \quad \text{Ecuación [3]}$$

donde:

$m_h$ = masa de carbono neto producido como gas en el espacio libre (mg);

D*p* = media de la diferencia entre la presión inicial y la presión final en los recipientes de ensayo menos la media correspondiente de los recipientes en blanco (milibares);

▼**M6**

$V_h$ = volumen del espacio libre en el recipiente (l);

0,1 = conversión tanto de newtons/$m^2$ a milibares como de $m^3$ a litros.

La ecuación [4] debe utilizarse para la temperatura normal de incubación de 35 °C (308 K):

$$m_h = 0{,}468(\Delta p \cdot V_h) \quad \text{Ecuación [4]}$$

*Nota:* Cálculo alternativo del volumen. Las lecturas del manómetro se convierten a ml de gas producido mediante la curva patrón generada representando el volumen (ml) inyectado frente a la lectura del manómetro (apéndice 2). El número de moles (n) de gas en el espacio libre de cada recipiente se calcula dividiendo la producción de gas acumulada (ml) por 25 286 ml/mol, que es el volumen ocupado por un mol de gas a 35 °C y con una presión atmosférica normal. Dado que 1 mol de $CH_4$ y 1 mol de $CO_2$ contienen cada uno 12 g de carbono, la cantidad de carbono (mg) en el espacio libre ($m_h$) se obtiene mediante la ecuación [5]:

$$m_h = 12 \times 10^3 \times n \quad \text{Ecuación [5]}$$

Racionalización para tener en cuenta la producción de gas de control en blanco:

$$m_h = \frac{12\ 000 \times \Delta V}{25\ 286} = 0{,}475\Delta V \quad \text{Ecuación [6]}$$

donde:

$m_h$ = masa de carbono neto producido como gas en el espacio libre (mg);

$\Delta V$ = media de la diferencia entre el volumen de gas producido en el espacio libre de los recipientes de ensayo y los recipientes de control en blanco;

25286 = volumen ocupado por 1 mol de gas a 35 °C y 1 atmósfera.

45. El curso de la biodegradación puede seguirse representando el aumento de la presión acumulada D*p* (milibares) frente al tiempo, si procede. Partiendo de esta curva, se identifica y registra la fase de latencia (días). La fase de latencia es el tiempo transcurrido desde el comienzo del ensayo hasta que comienza una degradación significativa(se puede consultar un ejemplo en el apéndice 3). Si se han tomado y analizado muestras intermedias de sobrenadante (véanse los puntos 40, 46 y 47), entonces puede representarse el C total producido (en gas más en líquido), en lugar de solo la presión acumulada.

**Carbono en el líquido**

46. La cantidad de metano en el líquido se ignora, ya que se sabe que su solubilidad en agua es muy baja. Calcule la masa de carbono inorgánico en el líquido de los recipientes de ensayo utilizando la ecuación [7]:

$$m_l = C_{net} \times V_l \quad \text{Ecuación [7]}$$

donde:

$m_l$ = masa de carbono inorgánico en el líquido (mg);

$C_{net}$ = concentración de carbono inorgánico en los recipientes de ensayo menos la de los recipientes de control al final del ensayo (mg/l);

$V_l$ = volumen de líquido en el recipiente (l).

▼M6

**Carbono gasificado total**

47. Calcule la masa total de carbono presente gasificado en el recipiente utilizando la ecuación [8]:

$$m_t = m_h + m_l \quad \text{Ecuación [8]}$$

donde:

$m_t$ = masa total de carbono gasificado (mg);

$m_h$ y $m_l$ se corresponden con las definiciones anteriores.

**Carbono de la sustancia problema**

48. Calcule la masa de carbono en los recipientes del ensayo, derivada de la sustancia problema añadida, utilizando la ecuación [9]:

$$m_v = C_c \times V_l \quad \text{Ecuación [9]}$$

donde:

$m_v$ = masa de carbono de la sustancia problema (mg);

$C_c$ = concentración de carbono de la sustancia problema en el recipiente de ensayo (mg/l);

$V_l$ = volumen de líquido del recipiente de ensayo (l).

**Grado de biodegradación**

49. Calcule el porcentaje de biodegradación correspondiente al gas del espacio libre mediante la ecuación [10] y el porcentaje total de biodegradación mediante la ecuación [11]:

$$D_h = (m_h / m_v) \times 100 \quad \text{Ecuación [10]}$$

$$D_t = (m_t / m_v) \times 100 \quad \text{Ecuación [11]}$$

donde:

$D_h$ = biodegradación correspondiente al gas del espacio libre (%);

$D_t$ = biodegradación total (%);

$m_h$, $m_v$ y $m_t$ se corresponden con las definiciones anteriores.

El grado de biodegradación primaria se calcula a partir de las mediciones (opcionales) de la concentración de la sustancia problema al principio y al final de la incubación, mediante la ecuación [12]:

$$D_p = (1 - S_e / S_i) \times 100 \quad \text{Ecuación [12]}$$

donde:

$D_p$ = degradación primaria de la sustancia problema (%);

$S_i$ = concentración inicial de la sustancia problema (mg/l);

$S_e$ = concentración de la sustancia problema al final (mg/l).

Si el método de análisis indica concentraciones importantes de la sustancia problema en el inóculo de lodo anaeróbico no modificado, se debe utilizar la ecuación [13]:

▼M6

$$D_p^1 = [1 - (S_e - S_{eb}) / (S_i - S_{ib})] \times 100 \quad \text{Ecuación [13]}$$

donde:

$D_p^1$ = degradación primaria corregida de la sustancia problema (%);

$S_{ib}$ = concentración «aparente» inicial de la sustancia problema en los controles en blanco (mg/l);

$S_{eb}$ = concentración «aparente» de la sustancia problema en los controles en blanco al final (mg/l).

**Validez de los resultados**

50. Solo deben utilizarse las lecturas de presión de los recipientes que no presenten coloración rosa (véase el punto 33). La contaminación por oxígeno se minimiza mediante el uso de unas técnicas de manipulación anaeróbica adecuadas.

51. Hay que tener en cuenta que el ensayo es válido si la sustancia referencia alcanza una meseta que constituya una biodegradación superior al 60 % ([1]).

52. Si el pH al final del ensayo supera el intervalo de 7 ± 1 y se ha producido una biodegradación insuficiente, se debe repetir el ensayo con una mayor capacidad de tampón del medio.

**Inhibición de la degradación**

53. La producción de gas en los recipientes que contienen tanto la sustancia problema como la sustancia de referencia debe ser, como mínimo, igual a la de los recipientes que solo contienen la sustancia de referencia; de lo contrario, se indica una inhibición de la producción de gas. En algunos casos, la producción de gas en los recipientes que contienen la sustancia problema sin sustancia de referencia será inferior a la de los controles en blanco, lo que indica que la sustancia problema es inhibidora.

**Informe del ensayo**

54. El informe del ensayo deberá incluir la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— nombre común, nombre químico, número CAS, fórmula estructural y propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— pureza (impurezas) de la sustancia problema.

*Condiciones de ensayo:*

— volúmenes del líquido diluido del digestor ($V_l$) y del espacio libre ($V_h$) en el recipiente;

— descripción de los recipientes de ensayo y principales características de la medición del biogás (por ejemplo, tipo de manómetro) y del analizador de CI;

— aplicación de la sustancia problema y de la sustancia de referencia al sistema del ensayo: la concentración de ensayo utilizada y eventual uso de disolventes;

— detalles del inóculo utilizado: nombre de la planta de tratamiento de aguas residuales, descripción del origen de las aguas residuales tratadas (por ejemplo, temperatura de trabajo, tiempo de retención del lodo, predominancia de aguas domésticas, etc.), concentración, cualquier información necesaria para fundamentar esto e información sobre el eventual tratamiento previo del inóculo (por ejemplo, digestión previa, exposición previa);

— temperatura de incubación;

— número de réplicas.

([1]) Esto debe volver a evaluarse si se incluyen sustancias de referencia adsorbentes e insolubles.

▼M6

*Resultados:*

— valores de pH y CI al final del ensayo;

— concentración de la sustancia problema al principio y al final del ensayo, si se hubiera realizado una medición específica;

— todos los datos medidos y recopilados con los recipientes de ensayo, blanco, sustancia de referencia y control de inhibición, si procede [por ejemplo, presión en milibares, concentración de carbono inorgánico (mg/l)], en formato tabular (los datos medidos del espacio libre y del líquido deben indicarse por separado);

— tratamiento estadístico de los datos, duración del ensayo y diagrama de la biodegradación de la sustancia problema, la sustancia de referencia y el control de inhibición;

— porcentaje de biodegradación de la sustancia problema y la sustancia de referencia;

— motivos del eventual rechazo de los resultados del ensayo;

— discusión de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Los capítulos siguientes del presente anexo.

C.4. Determinación de la biodegradabilidad «fácil»

C.9. Biodegradación. Método de Zahn-Wellens

C.10. Prueba de simulación de tratamiento aeróbico de aguas residuales:

A: Unidades de lodo activado, B: Biopelículas

C.11. Biodegradación. Lodo activado: prueba de inhibición de la respiración

(2) OCDE (2009) Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II), OECD Guideline for Testing of Chemicals, Nº 302C, OCDE, París.

(3) Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga,U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989) Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, pp. 1527-1550. (Publicado también como ECETOC Technical Report Nº 28, junio de 1988).

(4) Shelton D.R. and Tiedje, J.M. (1984) General method for determining anaerobic biodegradation potential. Appl. Environ. Microbiology, 47, pp. 850-857.

(5) Owen, W.F., Stuckey, DC., Healy J.B., Jr, Young L.Y. and McCarty, P.L. (1979) Bioassay for monitoring biochemical methane potential and anaerobic toxicity. Water Res. 13, pp. 485-492.

(6) Healy, J.B.Jr. and Young, L.Y. (1979) Anaerobic biodegradation of eleven aromatic compounds to methane. Appl. Environ. Microbiol. 38, pp. 84-89.

(7) Gledhill, W.E. (1979) Proposed standard practice for the determination of the anaerobic biodegradation of organic chemicals. Documento de trabajo. Draft 2 Nº 35.24. American Society for Testing Materials, Filadelfia.

(8) Battersby, N.S. and Wilson, V. (1988) Evaluation of a serum bottle technique for assessing the anaerobic biodegradability of organic chemicals under methanogenic conditions. Chemosphere, 17, pp. 2441-2460.

(9) E1192-92. Standard Test Method for Determining the Anaerobic Biodegradation Potential of Organic Chemicals. ASTM, Filadelfia.

▼M6

(10) US-EPA (1998) Fate, Transport and Transformation Test Guidelines OPPTS 835.3400 Anaerobic Biodegradability of Organic Chemicals.

(11) Organización Internacional de Normalización (1995) ISO 11734. Calidad del agua. Evaluación de la biodegradabilidad anaerobia «final» de los compuestos orgánicos con lodos en digestión. Método por medida de la producción de biogás.

(12) Organización Internacional de Normalización (2003), ISO 13641-1. Calidad del agua. Determinación de la inhibición de la producción de gas de las bacterias anaerobias. Parte 1. Prueba general.

(13) Organización Internacional de Normalización (1995) ISO 10634 Calidad del agua. Líneas directrices para la preparación y tratamiento de los compuestos orgánicos poco solubles en agua para la subsecuente evaluación de su biodegradabilidad en medio acuoso.

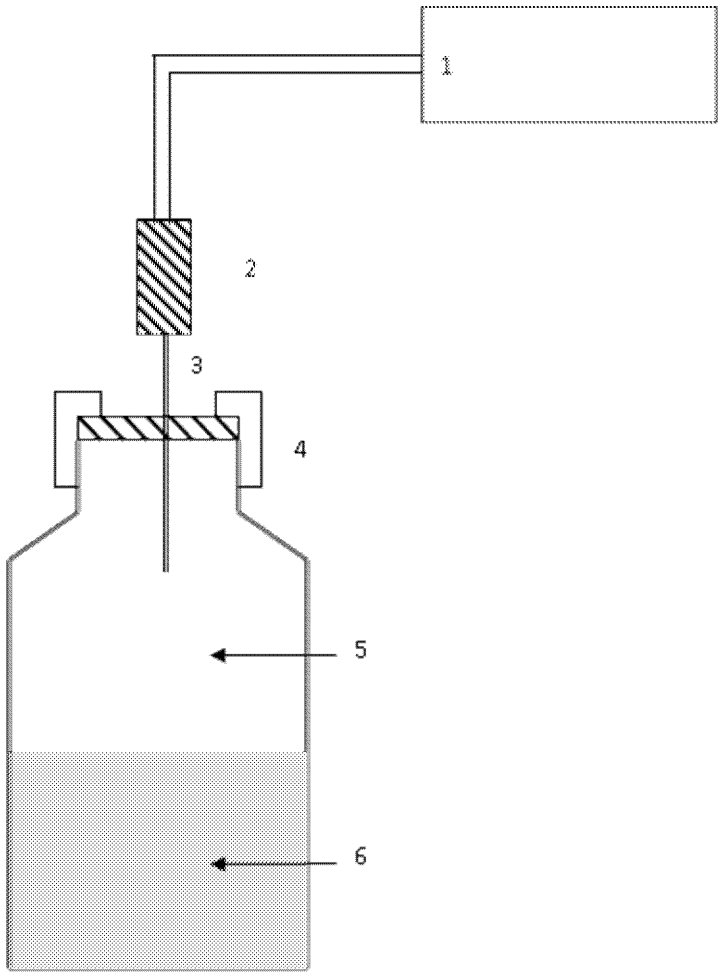
(14) Pagga, U. and Beimborn, D.B., (1993) Anaerobic biodegradation test for organic compounds. Chemosphere, 27, pp. 1499-1509.

(15) Organización Internacional de Normalización (1997) ISO 11923 Calidad de agua — Determinación de los sólidos en suspensión por filtración con filtros de fibra de vidrio.

▼**M6**

*Apéndice 1*

**Ejemplo de un aparato medidor de la producción de biogás mediante la presión de gas**




*Leyenda:*

*1* — Manómetro

*2* — Válvula estanca a los gases de 3 vías

*3* — Aguja de jeringa

*4* — Cierre estanco a los gases (cápsula y tapón)

*5* — Espacio libre ($V_h$)

*6* — Inóculo de lodo digerido ($V_l$)

Recipientes de ensayo en un ambiente a 35 °C ± 2 °C

▼M6

*Apéndice 2*

**Conversión del manómetro**

Las lecturas del manómetro pueden relacionarse con los volúmenes de gas mediante una curva patrón obtenida al inyectar volúmenes conocidos de aire a 35 °C ± 2 °C en frascos de suero que contienen un volumen de agua igual al de la mezcla de reacción, $V_R$:

— Ponga alícuotas de $V_R$ ml de agua, mantenida a 35 °C ± 2 °C, en cinco frascos de suero. Selle los frascos y colóquelos en un baño de agua a 35 °C durante una hora para equilibrar.

— Encienda el manómetro, deje que se estabilice y ajuste a cero.

— Introduzca la aguja de la jeringa a través del tapón de uno de los frascos, abra la válvula hasta que el medidor de presión lea cero y cierre la válvula.

— Repita el procedimiento con el resto de frascos.

— Inyecte 1 ml de aire a 35 °C ± 2 °C en cada frasco. Introduzca la aguja (unida al manómetro) a través del tapón de uno de los frascos y deje que la lectura de presión se estabilice. Registre la presión, abra la válvula hasta que la presión medida sea cero y, a continuación, cierre la válvula.

— Repita el procedimiento con el resto de frascos.

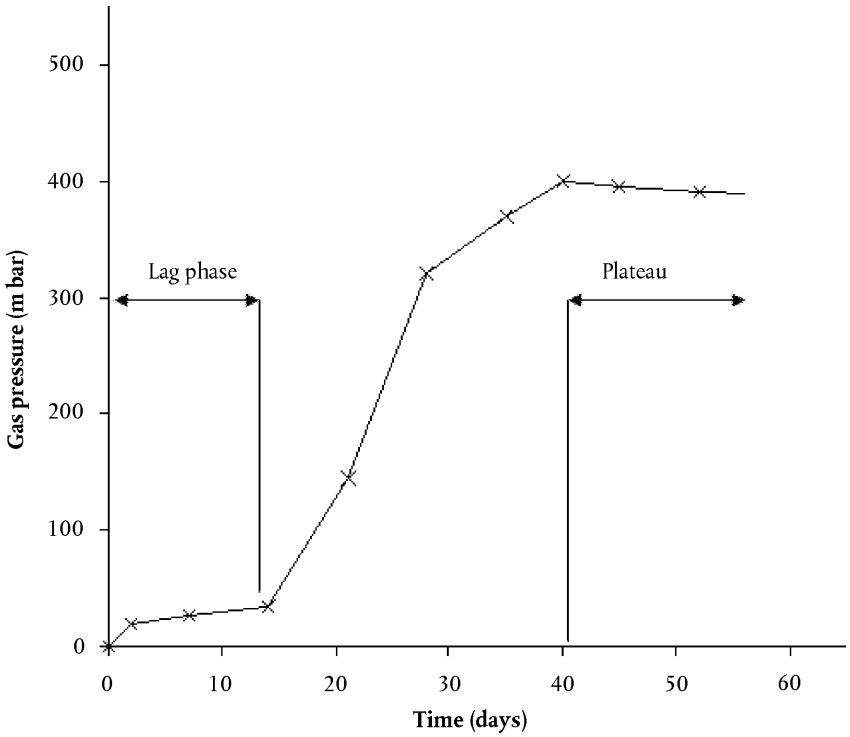
— Repita el procedimiento anterior en su totalidad utilizando 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 8 ml, 10 ml, 12 ml, 16 ml, 20 ml y 50 ml de aire.

— Trace una curva de conversión de la presión (Pa) frente al volumen de gas inyectado Vb (ml). La respuesta del instrumento es lineal a lo largo del intervalo de 0 a 70 000 Pa, y de 0 a 50 ml de producción de gas.

▼**M6**

*Apéndice 3*

**Ejemplo de curva de degradación (aumento de la presión neta acumulada)**



▼M6

*Apéndice 4*

**Ejemplo de fichas de datos para el ensayo de biodegradación anaeróbica — ficha de datos para la sustancia problema**

Laboratorio: ..... Sustancia problema: Ensayo nº: .....

Temperatura del ensayo: .....C) Volumen del espacio libre ($V_h$): .....(l) Volumen de líquido ($V_l$): .....(l)

Carbono en la sustancia problema $C_{c,v}$: .....(mg/l) $m_v$ [1]: .....(mg)

| Día | $p_1$ (ensayo) (mbar) | $p_2$ (ensayo) (mbar) | $p_3$ (ensayo) (mbar) | $p$ (ensayo) media (mbar) | $p_4$ (en blanco) (mbar) | $p_5$ (en blanco) (mbar) | $p_6$ (en blanco) (mbar) | $p$ (en blanco) media (mbar) | $p$ (neto) media de ensayo — en blanco (mbar) | $D\,p$ (neto) acumulada (mbar) | $m_h$ $C$ en espacio libre [2] (mg) | $D_h$ Biodegradación [3] (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | $C_{IC,\ 1}$ Ensayo (mg) | $C_{IC,\ 2}$ Ensayo (mg) | $C_{IC,\ 3}$ Ensayo (mg) | $C_{IC}$ Media del ensayo (mg) | $C_{IC,\ 4}$ En blanco (mg) | $C_{IC,\ 5}$ En blanco (mg) | $C_{IC,\ 6}$ En blanco (mg) | $C_{IC}$ Media en blanco (mg) | $C_{IC,\ net}$ Media de ensayo — en blanco (mg) | $m_l$ C líquido [4] (mg) | $m_t$ C total [5] (mg) | $D_t$ Biodegradación [6] (%) |
| CI (final) | | | | | | | | | | | | |
| pH (final) | | | | | | | | | | | | |

[1] Carbono en el recipiente de ensayo, $m_v$ (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$

[2] Carbono en el espacio libre, $m_h$ (mg) a una temperatura de incubación normal (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$

[3] Biodegradación calculada a partir del gas del espacio libre, $D_h$ (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$

[4] Carbono en el líquido, $m_l$ (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$

[5] Carbono gasificado total, mt (mg): $m^t + m^l$

[6] Biodegradación total, Dt (%): $Dt = (mt \times 100)/m^v$

▼M6

Laboratorio: ..... Sustancia de referencia: ..... Ensayo nº: .....

Temperatura del ensayo: .....(°C) Volumen de espacio libre ($V_h$): .....(l) Volumen de líquido ($V_l$): .....(litros)

Carbono en la sustancia de referencia $C_{c,v}$: (mg/l) $m_v$ [1]: .....(mg)

| Día | $p_1$ (ref.) (mbar) | $p_2$ (ref.) (mbar) | $p_3$ (ref.) (mbar) | $p$ (ref.) media (mbar) | $p_4$ (inhib.) (mbar) | $p_5$ (inhib.) (mbar) | $p_6$ (inhib.) (mbar) | $p$ (inhib.) media (mbar) | $p$ (ref.) ref. — en blanco (mbar) | $Dp$ (ref.) acumulada (mbar) | $m_h$ $C$ en espacio libre [2] (mg) | $D_h$ Biodegradación [3] (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| | $C_{IC,\ 1}$ ref. (mg) | $C_{IC,\ 2}$ ref. (mg) | $C_{IC,\ 3}$ ref. (mg) | $C_{IC}$ media ref. (mg) | $C_{IC,\ 4}$ inhib. (mg) | $C_{IC,\ 5}$ inhib. (mg) | $C_{IC,\ 6}$ inhib. (mg) | $C_{IC}$ media inhib. (mg) | $C_{IC,\ net}$ ref. — inhib. (mg) | $m_l$ C líquido [4] (mg) | $m_t$ C total [5] (mg) | $D_t$ Biodegradación [6] (%) |
| CI (final) | | | | | | | | | | | | |
| pH (final) | | | | | | | | | | | | |

([1]) Carbono en el recipiente de ensayo, $m_v$ (mg): $m_v = C_{C,v} \times V_l$
([2]) Carbono en el espacio libre, $m_h$ (mg) a una temperatura de incubación normal (35 °C): $m_h = 0{,}468\ \Delta p \times V_h$
([3]) Biodegradación calculada a partir del gas del espacio libre, $D_h$ (%): $D_h = (m_h \times 100)/m_v$
([4]) Carbono en el líquido, $m_l$ (mg): $m_l = C_{IC,net} \times V_l$
([5]) Carbono gasificado total, $m_t$ (mg): $m_h + m_l$
([6]) Biodegradación total, $D_t$ (%): $D_t = (m_t \times 100)/m_v$

▼M6

## C.44. LIXIVIACIÓN EN COLUMNAS DE SUELO

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 312 de la OCDE (2004). Las sustancias artificiales pueden llegar al suelo directamente mediante una aplicación deliberada (por ejemplo, productos agroquímicos) o por vías indirectas (por ejemplo, aguas residuales → lodos residuales → suelo o aire → deposición húmeda o seca). Para evaluar los riesgos de estas sustancias, es importante estimar su potencial de transformación en el suelo y de migración (lixiviación) a capas más profundas del suelo y, con el tiempo, a las aguas subterráneas.

2. Hay varios métodos disponibles para medir el potencial de lixiviación de las sustancias en el suelo en condiciones controladas en laboratorio, a saber: cromatografía en capa fina del suelo, cromatografía en capa gruesa del suelo, cromatografía en columna del suelo y mediciones de adsorción y desorción (1) (2). En lo que respecta a las sustancias no ionizadas, el coeficiente de reparto n-octanol-agua ($P_{ow}$) permite una primera estimación de su potencial de adsorción y lixiviación (3) (4) (5).

3. El método que se describe en este método de ensayo se basa en una cromatografía en columna de suelo de un suelo alterado (la definición se puede consultar en el apéndice 1). Se llevan a cabo dos tipos de experimentos para determinar, en primer lugar, el potencial de lixiviación de la sustancia problema, y, en segundo lugar, el potencial de lixiviación de los productos de transformación (estudio con residuos envejecidos) en suelos en condiciones controladas de laboratorio ([1]). El método de ensayo se basa en los métodos existentes (6) (7) (8) (9) (10) (11).

4. En un taller organizado por la OCDE sobre la selección de suelos y sedimentos, celebrado en Belgirate (Italia) en 1995 (12), se llegó a un acuerdo sobre el número y los tipos de suelo que se deben utilizar en este método de ensayo. En el taller también se hicieron recomendaciones sobre la recogida, la manipulación y el almacenamiento de muestras de suelo para llevar a cabo experimentos de lixiviación.

### PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

5. Se rellenan con suelo unas columnas hechas de material inerte adecuado (por ejemplo, vidrio, acero inoxidable, aluminio, teflón, PVC, etc.) y, posteriormente, se saturan y equilibran con una solución de «lluvia artificial» (la definición se puede consultar en el apéndice 1), y se dejan escurrir. A continuación, la superficie de cada columna de suelo se trata con la sustancia problema o con residuos envejecidos de la sustancia problema. Luego se aplica lluvia artificial a las columnas de suelo y se recoge el lixiviado. Después del proceso de lixiviado, se retira el suelo de las columnas y se divide en un número adecuado de segmentos, en función de la información que se necesite obtener del estudio. A continuación se determina en cada segmento de suelo y en el lixiviado la presencia de la sustancia problema y, si procede, de los productos de transformación o de otras sustancias de interés.

### APLICABILIDAD DEL MÉTODO DE ENSAYO

6. El método de ensayo es aplicable a las sustancias problema (no marcadas o marcadas radiactivamente: por ejemplo, $^{14}C$) para las cuales existe un método analítico con suficiente exactitud y sensibilidad. El método de ensayo no debe aplicarse a las sustancias volátiles del suelo y del agua y que, por lo tanto, no permanecen en el suelo o en el lixiviado en las condiciones experimentales de este método de ensayo.

### INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

7. Para medir el comportamiento de lixiviación en las columnas de suelo pueden utilizarse sustancias no marcadas o marcadas radiactivamente. Para estudiar la lixiviación de los productos de transformación (residuos

([1]) Los estudios de lixiviación en columnas con productos fitosanitarios pueden proporcionar información sobre la movilidad de una sustancia problema y de sus productos de transformación, y pueden complementar los estudios de sorción en lotes.

▼**M6**

envejecidos de la sustancia problema) y para calcular el balance de masas es necesario disponer de material marcado radiactivamente. Se recomienda el marcado con $^{14}C$, pero también pueden resultar útiles otros isótopos, como $^{13}C$, $^{15}N$, $^{3}H$, $^{32}P$. En la medida de lo posible, el marcador debe ubicarse en la parte o partes más estables de la molécula. La pureza de la sustancia problema debe ser al menos del 95 %.

8. La mayor parte de las sustancias deben aplicarse como sustancia individual. Sin embargo, en lo que respecta a las sustancias activas de productos fitosanitarios, se pueden utilizar productos formulados para estudiar la lixiviación de la sustancia problema original, pero su evaluación resulta particularmente necesaria cuando es probable que la mezcla afecte a la tasa de liberación (por ejemplo, fórmulas granulares de liberación o controlada). En lo que respecta a los requisitos específicos de las mezclas para diseñar el ensayo, puede resultar útil consultar a la autoridad reguladora antes de llevar a cabo dicho ensayo. En los estudios de lixiviación de residuos envejecidos, debe utilizarse la sustancia problema original pura.

9. Antes de llevar a cabo ensayos de lixiviación en columnas del suelo, debe disponerse, preferiblemente, de la siguiente información sobre la sustancia problema:

   (1) hidrosolubilidad [método de ensayo A.6] (13);

   (2) solubilidad en disolventes orgánicos;

   (3) presión de vapor [método de ensayo] (13) y constante de la ley de Henry;

   (4) coeficiente de reparto n-octanol/agua [métodos de ensayo A.8 y A.24 ] (13);

   (5) coeficiente de adsorción ($K_d$, $K_f$ o $K_{OC}$) [métodos de ensayo C.18 o C.19 ] (13);

   (6) hidrólisis [método de ensayo C.7] (13);

   (7) constante de disociación ($pK_a$) [OCDE TG 112] (25);

   (8) transformación aerobia y anaerobia en el suelo [método de ensayo C.23] (13).

   *Nota:* La temperatura a la cual se han realizado estas mediciones debe indicarse en los respectivos informes de ensayo.

10. La cantidad de sustancia problema aplicada a las columnas de suelo debe ser suficiente para permitir la detección de, al menos, el 0,5 % de la dosis aplicada en cualquiera de los segmentos individuales. En lo que respecta a las sustancias activas de productos fitosanitarios, la cantidad de sustancia problema aplicada puede corresponderse con la tasa de uso máxima recomendada (una sola aplicación).

11. Debe haber disponible un método analítico adecuado, de exactitud, precisión y sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia problema y, si procede, de sus productos de transformación en el suelo y en el lixiviado. También deben conocerse el límite de detección analítica de la sustancia problema y sus productos de transformación significativos (normalmente, al menos todos los productos de transformación ≥ 10 % de la dosis aplicada observados en los estudios de las vías de transformación, pero preferiblemente cualquier producto de transformación relevante con un posible riesgo) (véase el punto 17).

▼M6

SUSTANCIAS DE REFERENCIA

12. Para evaluar la movilidad relativa de la sustancia problema en el suelo deben utilizarse sustancias de referencia con un comportamiento de lixiviación conocido, como la atrazina o el monurón, que se pueden considerar lixiviadores moderados sobre el terreno (1) (8) (11). Asimismo, una sustancia de referencia polar no sorbente y no degradable (por ejemplo, tritio, bromuro, fluoresceína y eosina) para trazar el movimiento del agua en la columna puede resultar útil para confirmar las propiedades hidrodinámicas de la columna de suelo.

13. También puede resultar útil para emplear patrones analíticos para la caracterización o la identificación de los productos de transformación encontrados en los segmentos de suelo y en los lixiviados mediante cromatografía, espectroscopia u otros métodos relevantes.

DEFINICIONES Y UNIDADES

14. Véase el apéndice 1.

CRITERIOS DE CALIDAD

**Recuperación**

15. La suma de los porcentajes de la sustancia problema encontrados en los segmentos de suelo y en el lixiviado de la columna, después de la lixiviación, determina la recuperación para un experimento de lixiviación. Las recuperaciones deben encontrarse entre el 90 y el 110 %, en caso de sustancias marcadas radiactivamente (11), y entre el 70 y el 110 % en caso de sustancias no marcadas (8).

**Repetibilidad y sensibilidad del método analítico**

16. La repetibilidad del método analítico para cuantificar la sustancia problema y los productos de transformación puede comprobarse mediante un análisis duplicado del mismo extracto de un segmento de suelo o de un lixiviado (véase el punto 11).

17. El límite de detección (LOD) del método analítico de la sustancia problema y de los productos de transformación debe ser, como mínimo, de 0,01 mg $\cdot$ $kg^{-1}$ en cada segmento de suelo o lixiviado (como sustancia problema), o del 0,5 % de la dosis aplicada en cualquier segmento individual, si este valor es menor. El límite de cuantificación (LOQ) también debe especificarse.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ENSAYO

**Sistema de ensayo**

18. En el ensayo se utilizan columnas de lixiviación (divisibles o no divisibles) en secciones hechas de un material inerte adecuado (por ejemplo, vidrio, acero inoxidable, aluminio, teflón, PVC, etc.), con un diámetro interior mínimo de 4 cm y una altura mínima de 35 cm. Los materiales de las columnas deben evaluarse para establecer las posibles interacciones con la sustancia problema o sus productos de transformación. En el apéndice 2 se pueden consultar ejemplos de columnas adecuadas divisibles y no divisibles.

19. Para llenar y compactar las columnas de suelo se utilizan una cuchara, un émbolo y un aparato vibrador.

20. Para aplicar la lluvia artificial a las columnas de suelo, se pueden utilizar bombas de pistón o peristálticas, cabezales de ducha, frascos Mariotte o unos simples embudos de decantación.

▼M6

**Equipo de laboratorio y sustancias**

21. Se precisa el equipo normal de laboratorio y, en particular, el siguiente:

(1) instrumentos analíticos tales como equipos de cromatografía (de gases, de líquidos de alta resolución o de capa fina), incluidos los sistemas de detección adecuados para el análisis de sustancias marcadas o no marcadas, o un método de dilución isotópica inversa;

(2) instrumentos de identificación (por ejemplo, espectrometría de masas, cromatografía de gases con espectrometría de masas, cromatografía de líquidos de alta resolución con espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, etc.);

(3) contador de centelleo de líquidos para la sustancia problema marcada radiactivamente;

(4) oxidante para la combustión del material marcado;

(5) aparato de extracción (por ejemplo, tubos de centrífuga para la extracción en frío y aparato Soxhlet para la extracción continua bajo reflujo);

(6) instrumental para concentrar soluciones y extractos (por ejemplo, evaporador rotatorio).

22. Entre las sustancias utilizadas se incluyen las siguientes: disolventes orgánicos de grado analítico, como acetona, metanol, etc.; líquido de centelleo; solución de $CaCl_2$ 0,01 M en agua destilada o desionizada (equivalente a la lluvia artificial).

**Sustancia problema**

23. Para aplicar la sustancia problema a la columna de suelo debe disolverse en agua (desionizada o destilada). Si la sustancia problema es poco soluble en agua, puede aplicarse como producto formulado (si es necesario, después de suspenderla o emulsionarla en agua) o en algún disolvente orgánico. Si se utiliza un disolvente orgánico, este debe reducirse al mínimo y debe evaporarse de la superficie de la columna de suelo antes de iniciar el procedimiento de lixiviación. Las fórmulas sólidas, como los gránulos, deben aplicarse en su forma sólida sin agua; para que se produzca una distribución mejor por la superficie de la columna de suelo, el producto formulado puede mezclarse con una pequeña cantidad de arena de cuarzo (por ejemplo, 1 g) antes de la aplicación.

24. La cantidad de sustancia problema aplicada a las columnas de suelo debe ser suficiente para permitir en cualquiera de los segmentos la detección de, al menos, el 0,5 % de la dosis aplicada. En lo que respecta a las sustancias activas de los productos fitosanitarios, esta dosis puede basarse en la tasa de uso máxima recomendada (tasa de una sola aplicación) y, para la lixiviación de tanto la sustancia original como de las envejecidas, debe estar relacionada con el área superficial de la columna de suelo utilizada ([1]).

**Sustancia de referencia**

25. En los experimentos de lixiviación debe utilizarse una sustancia de referencia (véase el punto 12). Debe aplicarse a la superficie de la columna de suelo de la misma forma que la sustancia problema, con una tasa adecuada

([1]) La cantidad que debe aplicarse a las columnas de suelo cilíndricas puede calcularse con la fórmula siguiente:

$$M\ [\mu g] = \frac{A\ [kg/ha] \cdot 10^9 [\mu g/kg] \cdot d^2 [cm^2] \cdot \pi}{10^8 [cm^2/ha] \cdot 4}$$

donde:

M = cantidad aplicada por columna [µg]

A = tasa de aplicación [$kg \cdot ha^{-1}$]

d = diámetro de la columna de suelo [cm]

$\pi$ = 3,14

▼M6

que permita la detección correcta, bien como patrón interno junto con la sustancia problema en la misma columna de suelo, bien sola en una columna de suelo separada. Es preferible que ambas sustancias se evalúen en la misma columna, salvo cuando se hayan marcado de forma similar.

**Suelos**

*Selección del suelo*

26. Para llevar a cabo estudios de lixiviación con la sustancia problema original, deben utilizarse tres o cuatro suelos de diversos pH, contenido de carbono orgánico y textura (12). En la tabla 1 siguiente se incluye una orientación sobre la selección de suelos para realizar experimentos de lixiviación. En lo que respecta a las sustancias problema ionizables, los suelos seleccionados deben abarcar una gran variedad de pH para poder evaluar la movilidad de la sustancia en su forma ionizada y no ionizada; como mínimo, tres suelos deben tener un pH al que la sustancia problema se encuentre en su forma móvil.

*Tabla 1*

**Orientación sobre la selección de suelos para estudios de lixiviación**

| Nº de suelo | Valor de pH | Carbono orgánico % | Contenido de arcilla % | Textura (*) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | > 7,5 | 3,5 - 5,0 | 20 - 40 | Franco-arcilloso |
| 2 | 5,5 - 7,0 | 1,5 - 3,0 | 15 - 25 | Franco-limoso |
| 3 | 4,0 - 5,5 | 3,0 - 4,0 | 15 -30 | Limoso |
| 4 | < 4,0 - 6,0 | < 0,5 - 1,5 ‡ | < 10 - 15 | Franco-arenoso |
| 5 | < 4,5 | > 10 | < 10 | Franco-arenoso/arena |

(*) Con arreglo a los sistemas de la FAO y el USDA (14).

§ Las variables respectivas deben reflejar, preferentemente, los valores del intervalo indicado. Sin embargo, si se experimentan dificultades para encontrar material de suelo adecuado, se aceptan valores inferiores al mínimo indicado.

‡ Los suelos con menos del 0,3 % de carbono orgánico pueden alterar la correlación entre el contenido orgánico y la adsorción. Por lo tanto, se recomienda utilizar suelos con un contenido de carbono orgánico mínimo del 0,3 %.

# Los suelos con un gran contenido de carbono (por ejemplo, más del 10 %) no resultan aceptables legalmente, por ejemplo, para registrar plaguicidas.

27. En ocasiones, es posible que se necesiten otros tipos de suelo para representar regiones más frías, templadas y tropicales. Por lo tanto, si se prefieren otros tipos de suelo, deben caracterizarse mediante los mismos parámetros y deben presentar variaciones en sus propiedades similares a las de los suelos descritos en la orientación sobre la selección de suelos para estudios de lixiviación (véase la tabla 1 anterior), aunque no satisfagan los criterios con exactitud.

28. En los estudios de lixiviación con «residuos envejecidos» debe utilizarse un único suelo (12). Este suelo debe tener un contenido de arena superior al 70 % y un contenido de carbono orgánico entre el 0,5 y el 1,5 % (por ejemplo, el suelo nº 4 de la tabla 1). Es posible que haya que utilizar más suelos si los datos sobre los productos de transformación son importantes.

29. Todos los suelos deben caracterizarse, como mínimo, en lo que respecta a la textura (porcentaje de arena, limo y arcilla, con arreglo a los sistemas de clasificación de la FAO y del USDA (14)], el pH, la capacidad de intercambio catiónico, el contenido de carbono orgánico, la densidad aparente (en lo que respecta al suelo alterado) y la capacidad de retención de agua. La medición de la biomasa microbiana solo es necesaria en el suelo que se utiliza en el periodo de envejecimiento o incubación que se lleva a

▼M6

cabo antes que el experimento de lixiviación de las sustancias envejecidas. La información sobre otras propiedades del suelo (por ejemplo, la clasificación del suelo, la mineralogía de la arcilla o la superficie específica) puede resultar útil para interpretar los resultados de este estudio. Para determinar las características del suelo se pueden utilizar los métodos recomendados en las referencias (15) (16) (17) (18) (19).

*Recogida y conservación de los suelos*

30. Los suelos deben tomarse de la capa superior (horizonte A), a una profundidad máxima de 20 cm. Deben retirarse los restos de vegetación, macrofauna y piedras. Los suelos (salvo los utilizados para envejecer la sustancia problema) se secan al aire a temperatura ambiente (preferiblemente, entre 20 y 25 °C). Se efectúa una desagregación con la fuerza mínima, de modo que la textura original del suelo cambie lo menos posible. Los suelos se tamizan con un tamiz de ≤ 2 mm. Se recomienda una homogeneización cuidadosa, ya que esto aumenta la reproducibilidad de los resultados. Antes de utilizar los suelos, se pueden conservar a temperatura ambiente y mantenerse secos al aire (12). No se recomienda ningún límite de tiempo de conservación, pero los suelos almacenados durante más de tres años deben volver a analizarse, antes de usarlos, para determinar su contenido de carbono orgánico y pH.

31. Debe disponerse de información detallada sobre el historial de las zonas del terreno en las que se hayan recogido los suelos del ensayo. Los detalles deben incluir la ubicación exacta [definida exactamente por sus coordenadas geográficas o de UTM (proyección universal transversal de Mercator/cero geodésico horizontal europeo)], la cubierta de vegetación, los tratamientos con sustancias fitosanitarias, los tratamientos con fertilizantes orgánicos e inorgánicos, la adición de materiales biológicos o la contaminación accidental (12). Si el suelo se hubiera tratado con la sustancia problema o con sus análogos estructurales durante los cuatro años anteriores, no debe utilizarse en estudios de lixiviación.

*Condiciones de ensayo*

32. Durante el periodo del ensayo, las columnas de lixiviación del suelo deben mantenerse en la oscuridad y a temperatura ambiente, siempre que esta temperatura se mantenga en un intervalo de ± 2 °C. Las temperaturas recomendadas se encuentran entre 18 y 25 °C.

33. Debe aplicarse lluvia artificial ($CaCl_2$ 0,01 M) continuamente sobre la superficie de las columnas de suelo, a una tasa de 200 mm durante 48 horas ([1]); esta tasa equivale a una aplicación de 251 ml para una columna de un diámetro interior de 4 cm. Si fuera necesario para la finalidad del ensayo, se pueden utilizar también otras tasas de precipitaciones artificiales y duraciones más prolongadas.

*Realización del ensayo*

*Lixiviación con la sustancia problema original*

34. Se rellenan columnas de lixiviación, al menos por duplicado con tierra no tratada, secada al aire y tamizada (menos de 2 mm) hasta alcanzar una altura aproximada de 30 cm. Para obtener una compactación uniforme, se añade tierra a las columnas en pequeñas porciones con una cuchara y se presiona con un émbolo, con una vibración simultánea y suave de la

([1]) Este sistema simula unas precipitaciones extremadamente intensas. Las precipitaciones anuales medias en, por ejemplo, Europa Central, son del orden de 800 a 1 000 mm.

▼M6

columna, hasta que la parte superior de la columna de suelo deje de hundirse. Se requiere un relleno uniforme para obtener resultados reproducibles de las columnas de lixiviación. Se puede obtener más información sobre las técnicas de relleno de las columnas en las referencias (20), (21) y (22). Para controlar la reproducibilidad del procedimiento de relleno, se calcula el peso total del suelo rellenado en las columnas ([1]); los pesos de las columnas duplicadas deben ser similares.

35. Después del relleno, las columnas de suelo se humedecen previamente con lluvia artificial ($CaCl_2$ 0,01 M), de abajo arriba, para desplazar el aire de los poros del suelo mediante el agua. Posteriormente, se deja que las columnas de suelo se equilibren y el agua sobrante se elimina por gravedad. En la referencia (23) se pueden consultar métodos de saturación de columnas.

36. A continuación, la sustancia problema o la sustancia de referencia se aplican a las columnas de suelo (véanse también los puntos 23-25). Para conseguir una distribución homogénea, las soluciones, suspensiones o emulsiones de la sustancia problema o de la sustancia de referencia deben aplicarse de manera uniforme sobre la superficie de las columnas de suelo. Si se recomienda la incorporación al suelo para aplicar una sustancia problema, debe mezclarse con una pequeña cantidad (por ejemplo, 20 g) de tierra y añadirse a la superficie de la columna de suelo.

37. A continuación, las superficies de las columnas de suelo se cubren con un disco de vidrio sinterizado, perlas de vidrio, filtros de fibra de vidrio o un papel de filtro redondo para distribuir la lluvia artificial de manera uniforme por toda la superficie, así como para evitar que las gotas de lluvia alteren la superficie del suelo. Cuanto más grande sea el diámetro de la columna, más cuidado habrá que tener con la aplicación de la lluvia artificial en las columnas de suelo con el fin de garantizar una distribución uniforme de la lluvia artificial por la superficie del suelo. A continuación, se añade la lluvia artificial a las columnas de suelo por goteo, con la ayuda de una bomba de pistón o peristáltica, o con un embudo de decantación. Preferentemente, los lixiviados deben recogerse por fracciones y deben registrarse sus volúmenes respectivos ([2]).

38. Tras la lixiviación y después de dejar que las columnas se drenen, las columnas de suelo se dividen en un número adecuado de segmentos, según la información que se necesite obtener del estudio; los segmentos se someten a extracción con los disolventes o las mezclas de disolventes adecuados, y se analiza su contenido de sustancia problema y, si procede, de productos de transformación, de radiactividad total y de sustancia de referencia. Los lixiviados o las fracciones de lixiviado se analizan directamente o previa extracción con respecto a los mismos productos. Cuando se utiliza la sustancia problema marcada radiactivamente, deben identificarse todas las fracciones que contengan $\geq$ 10 % de la radiactividad aplicada.

*Lixiviación con residuos envejecidos*

39. El suelo fresco (no secado al aire previamente) se trata a una tasa correspondiente a la superficie de las columnas de suelo (véase el punto 24) con la sustancia problema marcada radiactivamente e incubada en condiciones aerobias de acuerdo con el método de ensayo C.23 (13). El periodo de incubación (envejecimiento) debe ser lo suficientemente largo como para producir unas cantidades importantes de productos de transformación; se

([1]) A continuación se incluyen varios ejemplos de densidades aparentes para suelos alterados:para un suelo arenoso, 1,66 g · $ml^{-1}$
para un suelo franco-arenoso, 1,58 g · $ml^{-1}$
para un suelo franco, 1,17 g · $ml^{-1}$
para un suelo limoso, 1,11 · g $ml^{-1}$

([2]) Los volúmenes típicos de lixiviado varían entre 230 y 260 ml, que corresponden aproximadamente al 92-104 % de la lluvia artificial total aplicada (251 ml) cuando se utilizan columnas de suelo de 4 cm de diámetro y 30 cm de longitud.

▼M6

recomienda un periodo de envejecimiento de una semivida de la sustancia problema ([1]), pero no debe ser superior a 120 días. Antes de la lixiviación, se analiza el suelo envejecido para determinar la sustancia problema y sus productos de transformación.

40. Las columnas de lixiviación se rellenan hasta alcanzar una altura de 28 cm con el mismo suelo (pero secado al aire) utilizado en el experimento de envejecimiento como se describe en el punto 34, y también se determina el peso total de las columnas de suelo rellenadas. A continuación, las columnas de suelo se humedecen previamente, tal y como se describe en el punto 35.

41. Luego se aplican la sustancia problema y sus productos de transformación a la superficie de las columnas de suelo, en forma de residuos de suelo envejecido (véase el punto 39), formando un segmento de suelo de 2 cm. La altura total de las columnas de suelo (suelo no tratado + suelo envejecido) no debe superar, preferiblemente, los 30 cm (véase el punto 34).

42. La lixiviación se lleva a cabo tal y como se describe en el punto 37.

43. Después de la lixiviación, los segmentos de suelo y los lixiviados se analizan como se indica en el punto 38 para determinar la sustancia problema, sus productos de transformación y la radiactividad no extraída. Para determinar qué cantidad de residuos envejecidos se ha retenido en la capa superior de 2 cm después de la lixiviación, este segmento debe analizarse por separado.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

44. Las cantidades de sustancia problema, productos de transformación, residuos no extraíbles y, si se hubiera incluido, sustancia de referencia, deben expresarse en forma de porcentaje de la dosis inicial aplicada por cada segmento de suelo y fracción de lixiviado. Debe incluirse una representación gráfica de cada columna, trazando los porcentajes obtenidos en función de la profundidad del suelo.

45. Cuando se incluya una sustancia de referencia en estos estudios de lixiviación de columnas, la lixiviación de una sustancia puede evaluarse con arreglo a una escala relativa utilizando factores de movilidad relativa (FMR, su definición se puede consultar en el apéndice 3) (1) (11), que permite comparar los datos de lixiviación de varias sustancias obtenidos con distintos tipos de suelo. En el apéndice 3 se incluyen ejemplos de valores de FMR de diversas sustancias fitosanitarias.

46. Las estimaciones de $K_{oc}$ (coeficiente normalizado de adsorción de carbono) y $K_{om}$ (coeficiente normalizado de distribución de materia orgánica) también se pueden obtener de los resultados de lixiviación de las columnas, mediante la distancia de lixiviación o las correlaciones establecidas entre los FMR y el $K_{om}$ o el $K_{oc}$, (4) o aplicando una teoría cromatográfica simple (24). Sin embargo, este último método debe utilizarse con precaución, en particular cuando se tiene en cuenta que el proceso de lixiviación no conlleva únicamente condiciones de flujo saturado, sino más bien sistemas no saturados.

([1]) En el suelo se pueden formar varios productos de transformación principales, que también pueden aparecer en distintos momentos de un estudio de transformación. En esos casos, es posible que haya que realizar estudios de lixiviación con residuos envejecidos de distinta antigüedad.

▼M6

**Interpretación de los resultados**

47. Los estudios de lixiviación de columnas descritos en este método permiten calcular el potencial de lixiviación o de movilidad en el suelo de la sustancia problema (en el estudio de lixiviación original) o de sus productos de transformación (en el estudio de lixiviación de residuos envejecidos). Estos ensayos no predicen cuantitativamente el comportamiento de lixiviación en condiciones sobre el terreno, pero se pueden utilizar para comparar la «capacidad de lixiviación» de una sustancia con otras cuyo comportamiento de lixiviación pudiera conocerse (24). Del mismo modo, no miden cuantitativamente el porcentaje de sustancia aplicada que puede llegar a las aguas subterráneas (11). No obstante, los resultados de los estudios de lixiviación de columnas pueden servir de ayuda para decidir si deben realizarse otras pruebas de semicampo o sobre el terreno con sustancias que presentan un gran potencial de movilidad en los ensayos de laboratorio.

**Informe del ensayo**

48. El informe deberá incluir:

*Sustancia problema y sustancia de referencia (cuando se utilice):*

— nombre común, nombre químico (nomenclatura IUPAC y CAS), número CAS, estructura química (indicando la posición marcada cuando se utilice material marcado radiactivamente) y propiedades fisicoquímicas relevantes;

— purezas (impurezas) de la sustancia problema;

— pureza radioquímica de la sustancia marcada y actividad específica (si procede).

*Suelos de ensayo:*

— datos del lugar de recogida;

— propiedades de los suelos, como pH, contenido de carbono orgánico y de arcilla, textura y densidad aparente (con respecto al suelo alterado);

— actividad microbiana del suelo (únicamente con los suelos utilizados para envejecer la sustancia problema);

— duración de la conservación del suelo y condiciones de conservación.

*Condiciones de ensayo:*

— fechas de realización de los estudios;

— longitud y diámetro de las columnas de lixiviación;

— peso total del suelo de las columnas de suelo;

— cantidad de sustancia problema y, si procede, sustancia de referencia aplicada;

— cantidad, frecuencia y duración de la aplicación de lluvia artificial;

— temperatura del montaje experimental;

— número de réplicas (al menos dos);

— métodos de análisis de la sustancia problema, de los productos de transformación y, si procede, de la sustancia de referencia en los distintos segmentos de suelo y lixiviados;

— métodos de caracterización e identificación de los productos de transformación en los segmentos de suelo y lixiviados.

▼**M6**

*Resultados del ensayo:*

— tablas de resultados expresados en forma de concentraciones y porcentajes de dosis aplicada a los segmentos de suelo y los lixiviados;

— balance de masas, si procede;

— volúmenes de lixiviado;

— distancias de lixiviación y, si procede, factores de movilidad relativa;

— representación gráfica del porcentaje encontrado en los segmentos de suelo frente a la profundidad del segmento de suelo;

— evaluación e interpretación de los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Guth, J.A., Burkhard, N. and Eberle, D.O. (1976). Experimental Models for Studying the Persistence of Pesticides in Soil. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides.

(2) Russel, M.H. (1995). Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil. In progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, Vol. 9 (Environmental Behaviour of Agrochemicals — T.R. Roberts y P.C. Kearney, Eds.). J. Wiley & Sons.

(3) Briggs, G.G. (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficient, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J.Agric. Food Chem. 29, pp. 1050-1059.

(4) Chiou, C.T., Porter, P.E. and Schmedding, D.W. (1983). Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol. 17, pp. 227-231.

(5) Guth, J.A. (1983). Untersuchungen zum Verhalten von Pflanzenschutzmitteln im Boden. Bull. Bodenkundliche Gesellschaft Schweiz 7, 26-33.

(6) US-Environmental Protection Agency. (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(7) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(8) Anexo I de la Directiva 95/36/CE de la Comisión, de 14 de julio de 1995, por la que se modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios, DO L 172 de 22.7.1995, p. 8.

(9) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-2. Versickerungsverhalten von Pflanzenschutzmitteln.

(11) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(12) OCDE (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italia, 18-20 de enero de 1995.

(13) Los capítulos siguientes del presente anexo:

Capítulo A.4, Presión de vapor

Capítulo A.6, Hidrosolubilidad

▼**M6**

Capítulo A.8, Coeficiente de reparto, método del frasco agitado

Capítulo A.24, Coeficiente de reparto, método de HPLC

Capítulo C.7, Degradación — degradación abiótica: hidrólisis en función del pH

Capítulo C.18, Adsorción/desorción mediante un método equilibrado por lotes

Capítulo C.23, Transformación aerobia y anaerobia en el suelo.

(14) Soil Texture Classification (US and FAO systems). Weed Science, 33, Supl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26, 305 (1962).

(15) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller y D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series Nº 9, 2ª Ed.

(16) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties (A.L. Page, R.H. Miller y D.R. Kelney, Eds.). Agronomy Series Nº 9, 2ª Ed.

(17) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality — General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. 1ª Ed.

(18) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt/Main.

(19) Scheffer, F. and Schachtschabel, P. (1998). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(20) Weber, J.B. y Peeper, T.F. (1977). In Research Methods in Weed Science, 2nd Edition (B. Truelove, Ed.). Soc. Weed Sci., Auburn, Alabama, 73-78.

(21) Weber, J.B., Swain, L.R., Strek, H.J. and Sartori, J.L. (1986). In Research Methods in Weed Science, 3rd Edition (N.D. Camper, Ed.). Soc. Weed Sci., Champaign, IL, 190-200.

(22) Oliveira, et al. (1996). Packing of sands for the production of homogeneous porous media. Soil Sci. Soc. Amer. J. 60(1): pp. 49-53.

(23) Shackelford, C. D. (1991). Laboratory diffusion testing for waste disposal. — A review. J. Contam. Hydrol. 7, pp. 177-217.

(24) (Hamaker, J.W. (1975). Interpretation of soil leaching experiments. In Environmental Dynamics of Pesticides (R. Haque, V.H. Freed, Eds), 115-133. Plenum Press, Nueva York.

(25) OCDE (1981). Dissociation constants in water. OECD Guideline for Testing of Chemicals, Nº 4112, OCDE, París

▼M6

*Apéndice 1*

**Definiciones y unidades**

**Residuos de suelo envejecidos**: sustancia problema y productos de transformación presentes en el suelo tras la aplicación y después de un periodo lo suficientemente largo como para permitir el transporte y los procesos de adsorción, metabolismo y disipación que alteran la distribución y la naturaleza química de parte de la sustancia aplicada (1).

**Lluvia artificial**: solución de $CaCl_2$ 0,01 M en agua destilada o desionizada.

**Distancia media de lixiviación**: parte inferior de la sección de suelo en la que la sustancia recuperada acumulada es igual al 50 % de la sustancia problema recuperada total (experimento de lixiviación normal), o (parte inferior de la sección de suelo en la que la sustancia recuperada acumulada es igual al 50 % de la sustancia problema recuperada total) — ((grosor de la capa de residuos envejecidos)/2) [estudio de lixiviación con residuos envejecidos].

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**Lixiviado**: fase acuosa percolada a través de un perfil de suelo o una columna de suelo (1).

**Lixiviación**: proceso por el cual una sustancia se mueve hacia abajo, a través del perfil del suelo o de una columna de suelo (1).

**Distancia de lixiviación**: segmento de suelo más profundo en el que se ha encontrado un valor $\geq$ 0,5 % de la sustancia problema aplicada o del residuo envejecido después del proceso de lixiviación (equivalente a la profundidad de penetración).

**Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)**: el límite de detección (LOD) es la concentración de una sustancia por debajo de la cual no se puede distinguir la identidad de esa sustancia de la de artefactos analíticos. El límite de cuantificación (LOC) es la concentración de una sustancia por debajo de la cual no puede determinarse dicha concentración con una exactitud aceptable.

**Factor de movilidad relativa, FMR**: [distancia de lixiviación de la sustancia problema (cm)]/[distancia de lixiviación de la sustancia de referencia (cm)].

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Producto de transformación**: todas las sustancias resultantes de reacciones de transformación bióticas o abióticas de la sustancia problema, incluyendo el $CO_2$ y los productos ligados a los residuos.

**Suelo**: mezcla de componentes químicos minerales y orgánicos, en la que entre estos últimos se encuentran compuestos de alto contenido de carbono y nitrógeno, con grandes pesos moleculares, y que está poblada por pequeños organismos (microorganismos en su mayoría). El suelo se puede manipular en dos estados:

— no alterado, tal y como se ha ido desarrollando a lo largo del tiempo, en capas características de distintos tipos de suelo;

— alterado, tal y como suele encontrarse en campos de cultivo o como ocurre cuando se toman muestras cavando, que después se utilizan en este método de ensayo (2).

(1) Holland, P.T. (1996). Glossary of Terms Relating to Pesticides. IUPAC Reports on Pesticide (36). Pure & Appl. Chem. 68, pp. 1167-1193.

(2) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adoptada el 12 de mayo de 1981).

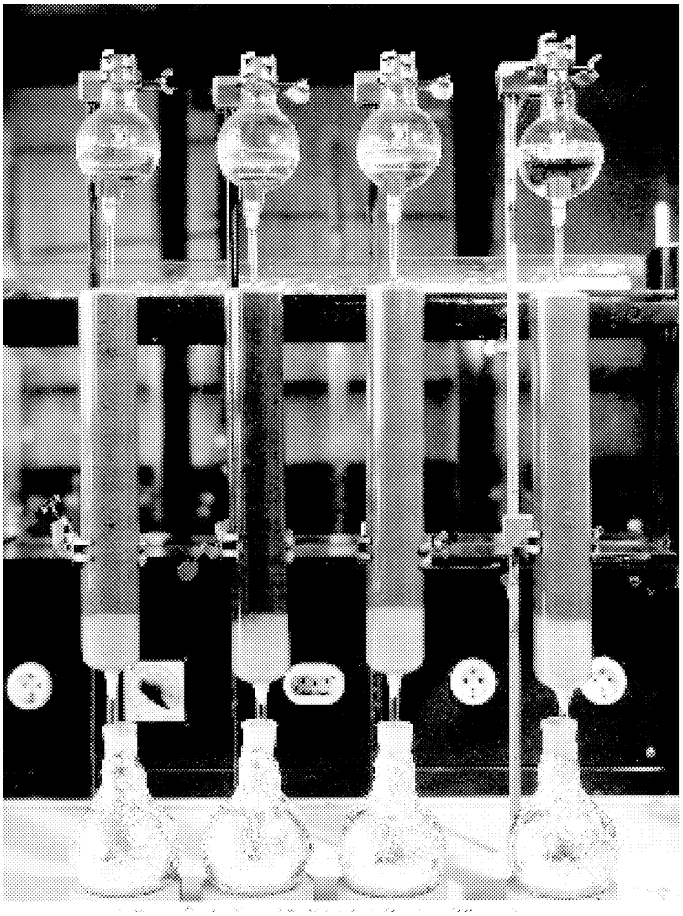
▼M6

*Apéndice 2*

*Figura 1:*

**Ejemplo de columnas de lixiviación no divisibles hechas de vidrio**

**Con una longitud de 35 cm y un diámetro interior de 5 cm (1)**



← Embudos de decantación para aplicar la lluvia artificial

← Disco de vidrio sinterizado para evitar la alteración de la superficie del suelo y distribuir la lluvia artificial de manera equilibrada

← Columna de vidrio llena de suelo de ensayo (cuando se evalúen productos fotolábiles, las columnas deben envolverse con papel de aluminio)

← Capa de arena de cuarzo

← Tapón de lana de vidrio para mantener el suelo en la columna

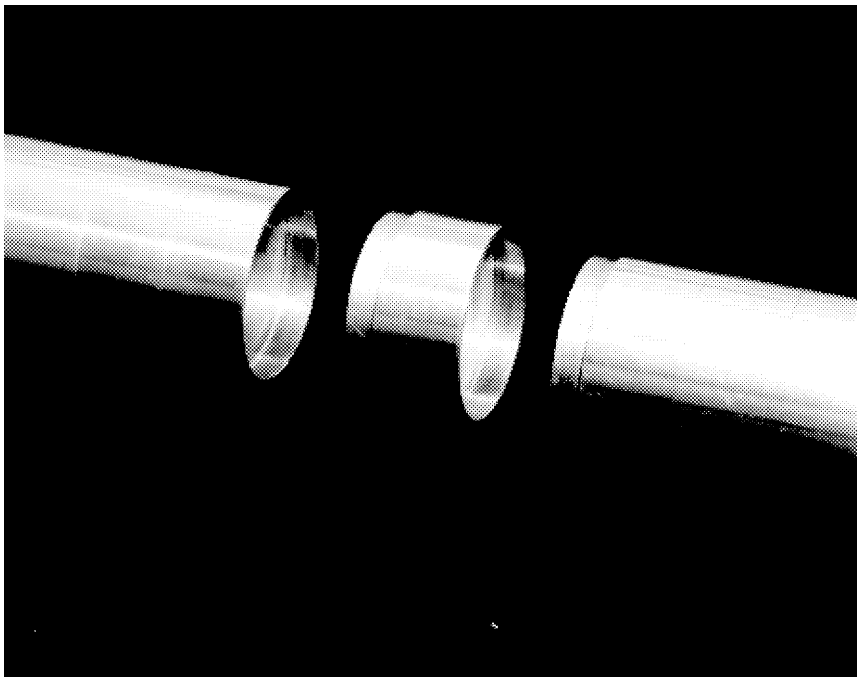
← Matraz redondo para recoger el lixiviado; se envuelve con papel de aluminio para excluir la fotólisis

(1) Drescher, N. (1985). Moderner Acker- und Pflanzenbau aus Sicht der Pflanzenschutzmittelindustrie. In Unser Boden — 70 Jahre Agrarforschung der BASF AG, 225-236. Verlag Wissenschaft und Politik, Colonia.

▼**M6**

*Figura 2:*

**Ejemplo de una columna metálica divisible con un diámetro interior de 4 cm (1)**



(1) Burkhard, N., Eberle D.O. and Guth, J.A. (1975). Model systems for studying the environmental behaviour of pesticides. Environmental Quality and Safety, Suppl. Vol. III, pp. 203-213.

▼M6

*Apéndice 3*

**Ejemplos de factores de movilidad relativa (*) (FMR) para diversas sustancias fitosanitarias (1) (2) y las correspondientes clases de movilidad**

| Intervalo de FMR | Sustancia (FMR) | Clase de movilidad |
|---|---|---|
| ≤ 0,15 | Paratión (< 0,15), Flurodifeno (0,15) | I<br>Inmóvil |
| 0,15 - 0,8 | Profenofós (0,18), Propiconazol (0,23), Diazinón (0,28), Diurón (0,38) Terbutilazina (0,52), Metidatión (0,56), Prometrina (0,59), Propazina (0,64), Alacloro (0,66), Metolacloro (0,68) | II<br>Ligeramente móvil |
| 0,8 - 1,3 | Monurón (**) (1,00), Atrazina (1,03), Simazina (1,04), Fluometurón (1,18) | III<br>Moderadamente móvil |
| 1,3 - 2,5 | Prometón (1,67), Cianazina (1,85), Bromacilo (1,91), Karbutilato (1,98) | IV<br>Bastante móvil |
| 2,5 - 5,0 | Carbofurano (3,00), Dioxacarb (4,33) | V<br>Móvil |
| > 5,0 | Monocrotofós (> 5,0), Dicrotofós (> 5,0) | VI<br>Muy móvil |

(*) El factor de movilidad relativa se deriva de la forma siguiente (3):

$$FMR = \frac{\text{distancia de lixiviación de la sustancia problema(cm)}}{\text{distancia de lixiviación de la sustancia de referencia(cm)}}$$

(**) Sustancia de referencia

\+ Otros sistemas para clasificar la movilidad de una sustancia en el suelo se basan en valores de $R_f$ obtenidos con cromatografía en capa fina del suelo (4) y en valores de $K_{oc}$ (5) (6).

(1) Guth, J.A. (1985). Adsorption/desorption. In Joint International Symposium «Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment.» Canterbury, UK, 1-3 de julio de 1985.

(2) Guth, J.A. and Hörmann, W.D. (1987). Problematik und Relevanz von Pflanzenschutzmittel-Spuren im Grund (Trink-) Wasser. Schr.Reihe Verein WaBoLu, 68, 91-106.

(3) Harris, C.I. (1967). Movement of herbicides in soil. Weeds 15, pp. 214-216.

(4) Helling, C.S. (1971). Pesticide mobility in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc. 35, pp. 743-748.

(5) McCall, P.J., Laskowski, D.A., Swann, R.L. and Dishburger, H.J. (1981). Measurements of sorption coefficients of organic chemicals and their use in environmental fate analysis. In Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington D.C.

(6) Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. BCPC Monograph No. 47 Pesticides in Soil and Water, pp. 165-174.

▼M6

## C.45. ESTIMACIÓN DE LAS EMISIONES AL MEDIO AMBIENTE DE MADERA TRATADA CON CONSERVANTES: MÉTODO DE LABORATORIO PARA PRODUCTOS DE MADERA NO RECUBIERTOS Y QUE ESTÁN EN CONTACTO CON AGUA DULCE O AGUA DE MAR

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 313 de la OCDE (2007). Las emisiones al medio ambiente de madera tratada con conservantes deben cuantificarse para poder llevar a cabo una evaluación de riesgos ambientales de la madera tratada. Este método de ensayo describe un método de laboratorio para estimar las emisiones de la madera tratada con conservantes en dos situaciones en las que las emisiones pueden entrar en contacto con el medio ambiente:

   — Emisiones de madera tratada en contacto con agua dulce. Las emisiones de la superficie de la madera tratada podrían entrar en el agua.

   — Emisiones de madera tratada en contacto con agua de mar. Las emisiones de la superficie de la madera tratada podrían entrar en el agua de mar.

2. Este método de ensayo va dirigido a la evaluación de las emisiones de la madera y de los productos de madera que no están recubiertos y están en contacto con agua dulce o agua de mar. Las clases de uso se utilizan internacionalmente y sirven para clasificar el peligro biológico al que puede verse sujeto el producto tratado. Las clases de uso definen también la situación en la que se utiliza el producto tratado y determinan los compartimentos ambientales (aire, agua y suelo) que se pueden encontrar en una situación de riesgo debido a la madera tratada con conservantes.

3. El método de ensayo consiste en un procedimiento de laboratorio para obtener muestras (medio receptor) del agua utilizada para sumergir la madera tratada, en intervalos de tiempo crecientes después de la exposición. La cantidad de emisiones en el medio receptor se relaciona con la superficie de la madera y con la duración de la exposición para estimar un flujo en $mg/m^2$/día. De esta forma, se puede estimar el flujo (tasa de lixiviación) después de aumentar los periodos de exposición.

4. La cantidad de emisiones se puede utilizar en una evaluación de riesgos ambientales de la madera tratada.

### CONSIDERACIONES INICIALES

5. El mecanismo de lixiviación en la superficie de la madera por agua dulce no se supone idéntico en su naturaleza y gravedad al lixiviado de una superficie de madera por el agua de mar. Por lo tanto, en lo que respecta a los productos conservantes de la madera o las mezclas utilizadas para tratar la madera usada en los entornos marinos, es necesario un estudio de lixiviación de la madera en relación con el agua de mar.

6. La madera, en el caso de la madera tratada con un conservante, debe ser representativa de la madera utilizada comercialmente. Debe tratarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante del conservante y de conformidad con las normas y especificaciones correspondientes. Deben indicarse los parámetros del acondicionamiento posterior al tratamiento de la madera, y previo al inicio del ensayo.

7. Las muestras de madera empleadas deben ser representativas de los productos utilizados (por ejemplo, con respecto a la especie, la densidad y otras características).

▼M6

8. El ensayo se puede aplicar a la madera mediante un proceso de penetración o una aplicación superficial, o bien a una madera tratada que tenga un tratamiento superficial obligatorio adicional (por ejemplo, pintura aplicada como requisito para su uso comercial).

9. La composición, la cantidad, el pH y la forma física del agua son importantes para determinar la cantidad, el contenido y la naturaleza de las emisiones de la madera.

PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ENSAYO

10. Las muestras problema de la madera tratada con conservantes se sumergen en agua. Se recoge el agua (medio receptor), que se analiza químicamente varias veces a lo largo de un periodo de exposición suficiente para realizar cálculos estadísticos. A partir de los resultados analíticos se calculan las tasas de emisiones en $mg/m^2$/día. Deben registrarse los periodos de muestreo. Los ensayos con muestras no tratadas pueden interrumpirse si los valores de referencia son nulos en los tres primeros puntos de datos.

11. La inclusión de muestras de madera no tratada permite determinar los niveles de referencia del medio receptor procedentes de la madera, aparte de las del conservante utilizado.

CRITERIOS DE CALIDAD

**Exactitud**

12. La exactitud del método de ensayo para estimar la emisión depende de que las muestras problema sean representativas de la madera tratada comercialmente, de la representatividad del agua en relación con el agua real y de la representatividad del régimen de exposición con respecto a las condiciones naturales.

13. La exactitud, la precisión y la repetibilidad del método analítico deben determinarse antes de llevar a cabo el ensayo.

**Reproducibilidad**

14. Se recogen y analizan tres muestras de agua, y el valor medio se toma como valor de emisión. La reproducibilidad de los resultados en un laboratorio y entre distintos laboratorios depende del régimen de inmersión y de la madera utilizada como muestra problema.

**Intervalo aceptable de resultados**

15. Se acepta el intervalo de resultados de este ensayo cuando los valores superiores e inferiores varían en menos de un orden de magnitud.

CONDICIONES DE ENSAYO

**Agua**

16. Casos de lixiviación de agua dulce: se recomienda usar agua desionizada (por ejemplo, ASTM D 1193 tipo II) en el ensayo de lixiviación cuando vaya a evaluarse madera expuesta a agua dulce. La temperatura del agua debe ser de 20 °C +/– 2 °C, y el pH y la temperatura del agua medidos deben incluirse en el informe del ensayo. El análisis de muestras del agua utilizada, tomadas antes de la inmersión de las muestras tratadas, permite estimar la presencia de las sustancias analizadas en el agua. Este control sirve para determinar los niveles de referencia de las sustancias que, posteriormente, se analizan químicamente.

▼M6

17. Casos de lixiviación de agua de mar: se recomienda usar agua de mar sintética (por ejemplo, ASTM D 1141, agua de mar de sustitución, sin metales pesados) en el ensayo de lixiviación cuando vaya a evaluarse madera expuesta a agua de mar. La temperatura del agua debe ser de 20 °C +/– 2 °C, y el pH y la temperatura del agua medidos deben incluirse en el informe del ensayo. El análisis de muestras del agua utilizada, tomadas antes de la inmersión de las muestras tratadas, permite estimar la presencia de las sustancias analizadas en el agua. Este control sirve para analizar los niveles de referencia de las sustancias importantes.

**Muestras de madera problema**

18. Las especies de madera deben ser típicas de las especies de madera utilizadas para evaluar la eficacia de los conservantes de la madera. Las especies recomendadas son *Pinus sylvestris* L. (pino silvestre), *Pinus resinosa* Ait. (pino rojo) o *Pinus* spp (pino). Se pueden realizar ensayos adicionales con otras especies.

19. Debe utilizarse madera de fibra recta, sin nudos. Debe evitarse el material de aspecto resinoso. La madera debe ser típica de la disponible en el mercado. Deben registrarse el origen, la densidad y el número de anillos anuales por cada 10 mm.

20. En cuanto a las muestras de madera problema, se recomiendan grupos de cinco, de conformidad con los bloques de tamaño (25 × 50 × 15 mm) de la norma EN 113 con las caras longitudinales paralelas a la fibra de la madera, aunque se pueden utilizar otras dimensiones, como 50 × 150 × 10 mm. La muestra problema debe quedar completamente sumergida en el agua. Las muestras problema serán de madera de albura al 100 %. Cada muestra se marca de manera unívoca para poder identificarla durante todo el ensayo.

21. Todas las muestras problema deben cepillarse, o serrarse en plano, y las superficies no deben lijarse.

22. El número de conjuntos de muestras de madera problema que se utilicen en el análisis es, como mínimo, de cinco: tres conjuntos de muestras se tratan con conservante, un conjunto de muestras no se trata y otro conjunto de muestras se utiliza para estimar el contenido de humedad de las muestras del ensayo antes del tratamiento (secadas en horno). Se preparan suficientes muestras de ensayo para permitir la selección de tres conjuntos de muestras que se encuentren en el intervalo del 5 % respecto al valor de la media de las retenciones de conservante del grupo de muestras problema.

23. Todas las muestras problema se sellan en el extremo con una sustancia que impida la penetración de conservantes en el corte transversal de las muestras, o impide la lixiviación de las muestras a través del corte transversal. Es necesario distinguir entre las muestras utilizadas en los procesos de aplicación superficial y en los de penetración, para aplicar el producto de sellado de los extremos. La aplicación del producto de sellado de los extremos debe tener lugar antes del tratamiento solo en los casos de aplicación superficial.

24. El corte transversal debe quedar abierto para los tratamientos de procesos de penetración. Por lo tanto, los extremos de las muestras deben sellarse al final del periodo de acondicionamiento. La emisión debe estimarse únicamente con respecto a la superficie longitudinal. Los productos de sellado deben inspeccionarse y, en caso necesario, volver a aplicarse antes de iniciar la lixiviación, y no deben volver a aplicarse una vez haya comenzado la lixiviación.

▼M6

**Recipiente de inmersión**

25. El recipiente está hecho de un material inerte y es suficientemente grande para contener cinco muestras de madera EN 113 en 500 ml de agua, lo que da como resultado una proporción de superficie con respecto al volumen de agua de 0,4 $cm^2$/ml.

**Estructura de las muestras problema**

26. Las muestras problema se colocan en una estructura que permita que todas las superficies expuestas de la muestra estén en contacto con el agua.

PROCEDIMIENTO DE TRATAMIENTO CON CONSERVANTE

**Preparación de las muestras problema tratadas**

27. La muestra de madera problema que debe tratarse con el conservante estudiado se trata siguiendo el método especificado para el conservante, que puede consistir en un proceso de tratamiento por penetración o en un proceso de aplicación superficial, el cual se puede llevar a cabo por inmersión, con un aerosol o con una brocha.

*Conservantes que deben aplicarse con un proceso de tratamiento por penetración*

28. Debe prepararse una solución del conservante que logre la absorción o la retención especificadas cuando se aplique mediante el proceso de tratamiento por penetración. La muestra de madera problema se pesa y se miden sus dimensiones. El proceso de tratamiento por penetración debe especificarse para la aplicación del conservante a la madera que se vaya a utilizar en la clase de uso 4 o 5. La muestra se vuelve a pesar después del tratamiento y se calcula la retención del conservante ($kg/m^3$) a partir de la ecuación siguiente:

$$\frac{\text{Masa después del tratamiento (kg)} - \text{Masa antes del tratamient (kg)}}{\text{Volumen de la muestra problema } (m^3)} \times \frac{\text{Concentración de la solución (\% masa/masa)}}{100}$$

29. En este ensayo se puede utilizar la madera tratada en una planta de procesamiento industrial (por ejemplo, por impregnación en vacío). Los procedimientos utilizados deben quedar registrados y la retención del material tratado de esta forma debe analizarse y registrarse.

*Conservantes que deben aplicarse con procesos de aplicación superficial*

30. Entre los procesos de aplicación superficial se incluyen la inmersión, la pulverización o el untado con brocha de las muestras de madera problema. El proceso y la tasa de aplicación (por ejemplo, litros/$m^2$) deben ser los especificados para la aplicación superficial del conservante.

31. Debe tenerse en cuenta también, en este caso, que se puede utilizar madera tratada en una planta de procesamiento industrial. Los procedimientos utilizados deben quedar registrados y la retención del material tratado de esta forma debe analizarse y registrarse.

**Acondicionamiento de las muestras problema después del tratamiento**

32. Después del tratamiento, las muestras problema tratadas deben acondicionarse de acuerdo con las recomendaciones del proveedor del conservante estudiado, con arreglo a los requisitos de la etiqueta del conservante o de conformidad con las prácticas de tratamiento comercial o la norma EN 252.

▼M6

**Preparación y selección de muestras problema**

33. Tras el acondicionamiento posterior al tratamiento, se calcula la retención media del grupo de muestras problema y se seleccionan aleatoriamente para realizar las mediciones de lixiviación tres conjuntos representativos de muestras con una retención que se encuentre en el intervalo del 5 % respecto al valor de la media del grupo.

PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN DE EMISIONES DE CONSERVANTE

**Método de inmersión**

34. Las muestras problema se pesan y; posteriormente, se sumergen totalmente en el agua y se registra la fecha y la hora. Se tapa el recipiente para reducir la evaporación.

35. El agua se cambia en los intervalos siguientes: 6 horas, 1 día, 2 días, 4 días, 8 días, 15 días, 22 días, 29 días (nota: estos tiempos son totales, no son tiempos de intervalos). Deben registrarse la hora y la fecha del cambio del agua, así como la masa de agua recuperada del recipiente.

36. Cada vez que se cambie el agua, debe conservarse una muestra del agua en la que hayan estado sumergidas las muestras problema para realizar análisis químicos posteriores.

37. El procedimiento de muestreo permite calcular el perfil de la cantidad de emisiones con respecto al tiempo. Las muestras deben almacenarse en unas condiciones que conserven el analito; por ejemplo, en un frigorífico en la oscuridad para reducir el crecimiento microbiano en la muestra antes del análisis.

MEDICIONES DE LAS EMISIONES

**Muestras tratadas**

38. El agua recogida se analiza químicamente para evaluar la sustancia activa o los productos de degradación o transformación relevantes, si procede.

**Muestras no tratadas**

39. La recogida del agua (medio receptor) en este sistema y el análisis posterior de las sustancias lixiviadas de las muestras de madera no tratada permiten estimar la posible tasa de emisión del conservante de la madera no tratada. La recogida y el análisis del medio receptor tras aumentar los periodos de exposición permiten estimar cómo cambia la tasa de emisión a lo largo del tiempo. Este análisis constituye un procedimiento de control para determinar los niveles de referencia de la sustancia problema en madera no tratada, con el objeto de confirmar que la madera utilizada como origen de las muestras no se había tratado previamente con el conservante.

DATOS E INFORME

**Análisis químicos**

40. El agua recogida se analiza químicamente y el resultado del análisis del agua se expresa en las unidades correspondientes; por ejemplo, µg/l.

**Notificación de datos**

41. Se registran todos los resultados. El apéndice incluye un ejemplo de una sugerencia de formulario de registro para un conjunto de muestras problema tratadas, así como una tabla resumen para calcular los valores medios de emisión en cada intervalo de muestreo.

42. El flujo de emisión diario en $mg/m^2$/día se calcula tomando la media de las tres mediciones de las tres réplicas y dividiendo por el número de días de inmersión.

▼M6

**Informe del ensayo**

43. En el informe del ensayo se proporcionará, como mínimo, la información siguiente:

— nombre del proveedor del conservante que se somete al ensayo;

— nombre o código específico y único del conservante evaluado;

— nombre comercial o común de las sustancias activas, con una descripción general de los coformulantes (por ejemplo, codisolvente, resina) y la composición en % m/m de los ingredientes;

— la retención o carga pertinente (en $kg/m^3$ o $l/m^2$, respectivamente) especificadas para la madera utilizada en contacto con el agua;

— las especies de madera utilizadas, con su densidad y tasa de crecimiento en anillos por cada 10 mm;

— la carga o retención del conservante evaluado y la fórmula utilizada para calcular la retención, expresada en $l/m^2$ o $kg/m^3$;

— el método de aplicación del conservante, especificando el calendario de tratamiento utilizado en un proceso de penetración, así como el método de aplicación en caso de utilizar un tratamiento superficial;

— la fecha de aplicación del conservante y una estimación del contenido de humedad de las muestras problema, expresado en forma de porcentaje;

— los procedimientos de acondicionamiento utilizados, especificando el tipo, las condiciones y la duración;

— especificación del producto de sellado de extremos utilizado y del número de aplicaciones;

— especificación de cualquier tratamiento posterior de la madera; por ejemplo, especificación del proveedor, el tipo, las características y la carga de una pintura;

— la hora y la fecha de cada inmersión, la cantidad de agua utilizada para sumergir las muestras problema en cada caso, y la cantidad de agua absorbida por la madera durante la inmersión;

— toda variación del método descrito y cualquier factor que pudiera haber afectado a los resultados.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Norma europea EN 84:1997: Protectores de la madera. Prueba de envejecimiento acelerado de las maderas tratadas antes de los ensayos biológicos. Prueba de deslavado.

(2) Norma europea EN 113/A1:2004. Protectores de la madera. Métodos de ensayo para la determinación de la eficacia preventiva contra los basidiomicetos destructores de la madera. Determinación de los valores tóxicos.

(3) Norma europea EN 252:1989. Ensayo de campo para determinar la eficacia protectora relativa de un protector de madera en contacto con el suelo.

(4) Norma europea EN 335 — Parte 1: 2006. Durabilidad de la madera y de los productos derivados de la madera. Clases de uso: definiciones — Parte 1: Aspectos generales.

(5) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1141 — 1998. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water, Without Heavy Metals. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.02.

(6) American Society for Testing and Materials Standards, ASTM D 1193-77 Type II — 1983. Specifications for Reagent Water. *Annual Book of ASTM Standards*, Volume 11.01.

▼M6

*Apéndice 1*

**Formulario de registro del método de ensayo**

**Estimación de las emisiones al medio ambiente de madera tratada con conservantes: método de laboratorio para productos de madera no recubiertos y que están en contacto con agua dulce o agua de mar**

| | |
|---|---|
| **Laboratorio de ensayo** | |

**Conservante de madera**

| | |
|---|---|
| Proveedor del conservante | |
| Nombre o código específico y único del conservante | |
| Nombre comercial o común del conservante | |
| Coformulantes | |
| Retención pertinente de la madera utilizada en contacto con el agua | |

**Aplicación**

| | |
|---|---|
| Método de aplicación | |
| Fecha de aplicación | |
| Fórmula utilizada para calcular la retención: | |
| Procedimiento de acondicionamiento | |
| Duración del acondicionamiento | |
| Producto de sellado de extremos / número de aplicaciones | |
| Tratamiento posterior | Si procede |

**Muestras problema**

| | |
|---|---|
| Especies de madera | |
| Densidad de la madera | (mínimo … valor medio … máximo) |
| Tasa de crecimiento (anillos por cada 10 mm) | (mínimo … valor medio … máximo) |
| Contenido de humedad | |

▼M6

| **Conjuntos de ensayo** (*) | **Retención (por ejemplo, kg/m$^3$)** |
|---|---|
| Tratado, «x» | Valor medio y desviación típica o intervalo de cinco muestras |
| Tratado, «y» | Valor medio y desviación típica o intervalo de cinco muestras |
| Tratado, «z» | Valor medio y desviación típica o intervalo de cinco muestras |
| Sin tratamiento | |
| **Variación de los parámetros del método de ensayo** | Por ejemplo, calidad del agua, dimensiones de las muestras problema, etc. |

(*) «x», «y» y «z» representan las tres muestras replicadas.

▼M6

| Hora | Cambio de agua | Masa de la muestra | | Absorción de agua | | Muestra de agua | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Con tratamiento (media) | Sin tratamiento | Con tratamiento (media) | Sin tratamiento | | Agua del ensayo | x | y | z |
| | Fecha | g | g | g | g | nº | pH | pH | pH | pH |
| Inicio | | | | | | | | | | |
| 6 h | | | | | | 1 | | | | |
| 24 h | | | | | | 2 | | | | |
| 2 días | | | | | | 3 | | | | |
| 4 días | | | | | | 4 | | | | |
| 8 días | | | | | | 5 | | | | |
| 15 días | | | | | | 6 | | | | |
| 22 días | | | | | | 7 | | | | |
| 29 días | | | | | | 8 | | | | |

▼M6

**Deben elaborarse tablas separadas para cada sustancia activa**

| Hora | Cambio de agua | Resultados analíticos | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Muestras no tratadas | | | Muestras tratadas | | | | | | | | | | | | |
| | | Concentración de sustancia activa en el agua mg/l | Cantidad emitida $mg/m^2$ | Tasa de emisión $mg/m^2$/día | Concentración de sustancia activa en el agua | | | | Cantidad emitida | | | | Tasa de emisión | | | |
| | | | | | x | y | z | Media | x | y | z | Media | x | y | z | Media |
| | Fecha | | | | mg/l | mg/l | mg/l | mg/l | $mg/m^2$ | $mg/m^2$ | $mg/m^2$ | $mg/m^2$ | $mg/m^2$/día | $mg/m^2$/día | $mg/m^2$/día | $mg/m^2$/día |
| 6 h | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 24 h | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 días | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 días | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 días | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 días | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 22 días | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 29 días | | | | | | | | | | | | | | | | |

*Nota:* Como los resultados de las muestras no tratadas pueden tener que utilizarse para corregir las tasas de emisión de las muestras tratadas, los resultados de las muestras no tratadas deben aparecer en primer lugar y todos los valores de las muestras tratadas deben ser «valores corregidos». Es posible que también se introduzca una corrección para tener en cuenta el análisis de agua inicial.

▼**M6**

*Apéndice 2*

**Definiciones**

**Sustancia**: sustancia o mezcla.

**Sustancia problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

▼M6

## C.46. BIOACUMULACIÓN EN OLIGOQUETOS BENTÓNICOS QUE VIVEN EN LOS SEDIMENTOS

### INTRODUCCIÓN

1. Este método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 315 de la OCDE (2008), sobre los animales endobentónicos que ingieren sedimentos y pueden quedar expuestos a sustancias ligadas a los sedimentos (1). Entre estas especies que ingieren sedimentos, los oligoquetos acuáticos desempeñan un papel importante en los fondos de los sistemas acuáticos. Viven en el sedimento y, con frecuencia, representan las especies más abundantes, en particular en los hábitats con condiciones ambientales adversas para otros animales. Mediante bioturbación del sedimento y al actuar como presa, estos animales pueden influir enormemente en la biodisponibilidad de dichas sustancias para otros organismos; por ejemplo, los peces bentívoros. A diferencia de los organismos epibentónicos, los oligoquetos acuáticos endobentónicos se refugian en el sedimento e ingieren partículas del sedimento por debajo de la superficie de este. Por ello, estos organismos quedan expuestos a sustancias por muchas vías de absorción, incluyendo el contacto directo, la ingestión de partículas de sedimento contaminadas, el agua intersticial y el agua sobrenadante. En el apéndice 6 se describen algunas especies de oligoquetos bentónicos que se utilizan actualmente en ensayos ecotoxicológicos.

2. Entre los parámetros que caracterizan la bioacumulación de una sustancia se incluyen, en primer lugar, el factor de bioacumulación (BAF), la constante de la velocidad de absorción del sedimento ($k_s$) y la constante de la velocidad de eliminación ($k_e$). En el apéndice 1 se incluyen definiciones detalladas de estos parámetros.

3. Para evaluar el potencial de bioacumulación de las sustancias en general, además de para investigar la bioacumulación de las sustancias que tienden a repartirse dentro o sobre los sedimentos, se requiere un método de ensayo específico para el compartimento (1) (2) (3) (4).

4. Este método de ensayo se ha diseñado para evaluar la bioacumulación de las sustancias asociadas a sedimentos en gusanos oligoquetos endobentónicos. El sedimento se enriquece con la sustancia problema. El uso de sedimento enriquecido va destinado a simular un sedimento contaminado.

5. Este método se basa en métodos existentes de ensayo de toxicidad y bioacumulación de sedimentos (1) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Los documentos siguientes también son útiles: los debates y resultados de un taller internacional (11) y el resultado de un ensayo interlaboratorios internacional (12).

6. Este ensayo se aplica a las sustancias orgánicas estables y neutras que tienden a asociarse con los sedimentos. La bioacumulación de compuestos organometálicos estables asociados a los sedimentos también puede medirse con este método (12). No es aplicable a los metales y otros oligoelementos (11) sin modificar el diseño del ensayo con respecto a los volúmenes de sustrato y agua y, posiblemente, el tamaño de la muestra de tejido.

### REQUISITO PREVIO E INFORMACIÓN SOBRE LA SUSTANCIA PROBLEMA

7. En la actualidad solo hay unas cuantas relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) firmemente establecidas con respecto a los procesos de bioacumulación (14). La relación más utilizada es la correlación entre la bioacumulación y la bioconcentración de las sustancias orgánicas estables y su lipofilia [expresada en forma de logaritmo del coeficiente de reparto octanol-agua (log $K_{ow}$); en el apéndice 1 se puede encontrar la definición], respectivamente, que se ha desarrollado para describir el reparto de una sustancia entre el agua y los peces. Las correlaciones del compartimento

▼M6

del sedimento también se han establecido mediante esta relación (15) (16) (17) (18). La correlación log $K_{ow}$-log BCF como QSAR principal puede resultar útil para realizar una primera estimación preliminar del potencial de bioacumulación de las sustancias asociadas a sedimentos. Sin embargo, el BAF puede verse afectado por el contenido de lípidos del organismo del ensayo y el contenido de carbono orgánico del sedimento. Por lo tanto, el coeficiente de reparto carbono orgánico-agua ($K_{ow}$) también se puede utilizar como determinante principal de la bioacumulación de sustancias orgánicas asociadas a sedimentos.

8. Este ensayo es aplicable a:

— sustancias estables y orgánicas con valores de log $K_{ow}$ entre 3,0 y 6,0 (5) (19), y sustancias superlipofílicas que reflejan un log $K_{ow}$ superior a 6,0 (5);

— sustancias que pertenecen a una clase de sustancias orgánicas conocidas por su potencial de bioacumulación en los organismos vivos; por ejemplo, agentes tensioactivos o sustancias con gran adsorción (por ejemplo, $K_{oc}$ alto).

9. La información sobre la sustancia problema, como las precauciones de seguridad, las condiciones adecuadas de conservación y la estabilidad, así como los métodos analíticos, debe obtenerse antes de iniciar el estudio. En las referencias (20) y (21) se ofrece más orientación sobre los análisis de sustancias con propiedades fisicoquímicas que dificultan estos ensayos. Antes de llevar a cabo un ensayo de bioacumulación con oligoquetos acuáticos, se debe conocer la siguiente información sobre la sustancia problema:

— nombre común, nombre químico (preferiblemente, el nombre IUPAC), fórmula estructural, número de registro CAS, pureza;

— solubilidad en agua [método de ensayo A.6 (22) ];

— coeficiente de reparto octanol-agua $K_{ow}$ [métodos de ensayo A.8, A.24 (22)];

— coeficiente de reparto sedimento-agua, expresado como $K_d$ o $K_{oc}$ [método de ensayo C.19 (22)];

— hidrólisis [método de ensayo C.7] (22);

— fototransformación en el agua (23);

— presión de vapor [método de ensayo A.4 (22)];

— biodegradabilidad fácil [métodos de ensayo C.4 y C.29 (22)];

— tensión superficial [método de ensayo A.5 (22)];

— concentración crítica de micelas (24).

Además, sería pertinente contar con la información siguiente, si estuviera disponible:

— biodegradación en el entorno acuático [métodos de ensayo C.24 y C.25 (22)];

— constante de la ley de Henry.

10. Las sustancias problema marcadas radiactivamente pueden facilitar el análisis de las muestras de agua, de sedimento y biológicas, y pueden utilizarse para determinar si deben llevarse a cabo o no la identificación y la cuantificación de los productos de degradación. El método descrito aquí se validó en un ensayo interlaboratorios internacional (12) para las sustancias marcadas con $^{14}C$. Si se miden los residuos radiactivos totales, el factor de bioacumulación (BAF) se basa en la sustancia original, incluyendo los eventuales productos de degradación retenidos. También se puede combinar un

▼M6

estudio
de metabolismo con un estudio de bioacumulación mediante el análisis y la cuantificación del porcentaje de la sustancia original y sus productos de degradación en muestras tomadas al final de la fase de absorción, o en el nivel máximo de bioacumulación. En cualquier caso, se recomienda que el cálculo del BAF se base en la concentración de la sustancia original en los organismos y no solo en los residuos radiactivos totales.

11. Además de las propiedades de la sustancia problema, otra información necesaria es la toxicidad para las especies de oligoquetos que se vayan a utilizar en el ensayo, como la concentración letal mediana ($LC_{50}$) durante el tiempo necesario para la fase de absorción a fin de garantizar que las concentraciones de exposición seleccionadas sean muy inferiores a los niveles tóxicos. Cuando sea posible, se dará prioridad a los valores de toxicidad derivados de estudios a largo plazo con parámetros subletales ($EC_{50}$). Si esos datos no estuvieran disponibles, un ensayo de toxicidad aguda en condiciones idénticas a las del ensayo de bioacumulación, o ensayos de toxicidad con otras especies representativas, pueden proporcionar información útil.

12. Debe disponerse de un método analítico adecuado de exactitud, precisión y sensibilidad conocidas para la cuantificación de la sustancia en las soluciones de ensayo, en el sedimento y en el material biológico, así como de datos sobre la preparación y la conservación de las muestras, junto con fichas de datos de seguridad de los materiales. Asimismo, deben conocerse los límites de detección analítica de la sustancia problema en el agua, el sedimento y el tejido de los gusanos. Si se utiliza una sustancia problema marcada radiactivamente, también deben conocerse la radiactividad específica (es decir, Bq $mol^{-1}$), la posición del átomo marcado radiactivamente y el porcentaje de radiactividad asociado a las impurezas. La radiactividad específica de la sustancia problema debe ser lo más alta posible para detectar las concentraciones de ensayo más bajas posibles (11).

13. Debe disponerse de la información sobre las características del sedimento que se vaya a utilizar (por ejemplo, el origen del sedimento o de sus componentes, el pH y la concentración de amoníaco del agua intersticial (sedimentos de campo), el contenido de carbono orgánico (COT), la granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla) y el porcentaje de peso seco (6).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

14. El ensayo está compuesto por dos fases: la fase de absorción (exposición) y la fase de eliminación (posexposición). Durante la fase de absorción, los gusanos se exponen a un sedimento enriquecido con la sustancia problema, que se recubre con agua reconstituida y se equilibra de la forma adecuada (11). Se mantienen en condiciones idénticas grupos de gusanos de control sin la sustancia problema.

15. En la fase de eliminación, los gusanos se trasladan a un sistema agua-sedimento sin sustancia problema. La fase de eliminación es necesaria para obtener información sobre la tasa a la que los organismos del ensayo excretan la sustancia problema (19) (25). Siempre es necesaria una fase de eliminación, a menos que la absorción de la sustancia problema durante la fase de exposición haya sido insignificante (por ejemplo, si no hay ninguna diferencia estadística entre la concentración de la sustancia problema en los gusanos del ensayo y en los gusanos de control). Si no se alcanza un estado estable durante la fase de absorción, se puede determinar la cinética ($BAF_k$, constante o constantes de la velocidad de absorción y de eliminación) a través de los resultados de la fase de eliminación. La variación de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de los gusanos es objeto de seguimiento a lo largo de ambas fases del ensayo.

16. Durante la fase de absorción, se realizan mediciones hasta que el BAF alcanza un estado de meseta o estable. De forma predeterminada, la duración de la fase de absorción debe ser de 28 días. La experiencia práctica ha demostrado que una fase de absorción de 12 a 14 días es suficiente para que varias sustancias orgánicas neutras y estables alcancen el estado estable (6) (8) (9).

▼M6

17. Sin embargo, si no se alcanza el estado estable en 28 días, la fase de eliminación comienza con el traslado de los oligoquetos expuestos a recipientes que contienen el mismo medio sin la sustancia problema. La fase de eliminación finaliza cuando se alcanza el 10 % de la concentración medida en los gusanos el día 28 de la fase de absorción, o tras una duración máxima de 10 días. El nivel de residuos en los gusanos al final de la fase de eliminación se indica como parámetro adicional; por ejemplo, como residuos no eliminados (NER). El factor de bioacumulación ($BAF_{ss}$) se calcula, preferentemente, como la proporción de concentración en los gusanos ($C_a$) y en el sedimento ($C_s$) en un estado aparentemente estable y como el factor de bioacumulación cinética, el $BAF_K$, esto es, como la proporción de la constante de la velocidad de absorción del sedimento ($k_s$) y la constante de la velocidad de eliminación ($k_e$), suponiendo una cinética de primer orden. Si no se alcanza un estado estable en 28 días, hay que calcular el $BAF_K$ a partir de la constante o constantes de la velocidad de absorción y de la velocidad de eliminación. Se puede consultar el cálculo en el apéndice 2. Si no se puede aplicar una cinética de primer orden, se deben utilizar modelos más complejos [apéndice 2 y referencia (25)].

18. Si no se logra un estado estable en 28 días, la fase de absorción puede prorrogarse, opcionalmente, sometiendo a grupos de gusanos expuestos –si estuvieran disponibles– a nuevas mediciones hasta alcanzar el estado estable; no obstante, y de forma paralela, la fase de eliminación debe comenzar el día 28 de la fase de absorción.

19. La constante de la velocidad de absorción, la constante de la velocidad de eliminación (o constantes, cuando se incluyan modelos más complejos), el factor de bioacumulación cinética ($BAF_k$) y, cuando sea posible, los límites de confianza de cada uno de estos parámetros se calculan a partir de ecuaciones de modelos informatizados (véanse los modelos en el apéndice 2). La adecuación del ajuste de cualquier modelo puede determinarse a partir del coeficiente de correlación o del coeficiente de determinación (si los coeficientes están próximos a la unidad, la adecuación es buena).

20. Para reducir la variabilidad de los resultados del ensayo de las sustancias orgánicas con gran lipofilia, los factores de bioacumulación deben expresarse, además, en relación con el contenido lipídico de los organismos del ensayo y con el contenido de carbono orgánico total (COT) del sedimento (factor de acumulación biota-sedimento o BSAF por kg de COT del sedimento y por kg de contenido lipídico de los gusanos). Este método se basa en experiencias y correlaciones teóricas para el compartimento acuático, donde –en lo que respecta a algunas clases de sustancias– hay una clara relación entre el potencial de bioacumulación de una sustancia y su lipofilia, algo que se ha establecido adecuadamente para los peces como organismos modelo (14) (25) (27). También hay una relación entre el contenido lipídico de los peces del ensayo y la bioacumulación observada de dichas sustancias. Se han encontrado correlaciones similares en los organismos bentónicos (15) (16) (17) (18). Si se dispone de suficiente tejido de gusanos, puede determinarse el contenido lipídico de los animales de ensayo con el mismo material biológico que se utilice para determinar la concentración de la sustancia problema. No obstante, resulta práctico utilizar animales de control aclimatados, por lo menos al principio o, preferiblemente, al final de la fase de absorción para medir el contenido lipídico, que después se puede utilizar para normalizar los valores de BAF.

VALIDEZ DEL ENSAYO

21. Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

— La mortalidad acumulada de los gusanos (controles y de tratamientos) hasta el final del ensayo no debe superar el 20 % del número inicial.

— Además, debe demostrarse que los gusanos se refugian en el sedimento para tener en cuenta la máxima exposición. En el punto 28 se ofrecen los detalles al respecto.

▼M6

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Especies de ensayo**

22. En el ensayo se pueden utilizar varias especies de oligoquetos acuáticos. En el apéndice 6 se enumeran las especies utilizadas con más frecuencia.

23. Deben realizarse a intervalos regulares (por ejemplo, cada mes) ensayos de toxicidad (96 horas, solo en agua) con un tóxico de referencia, como el cloruro de potasio (KCl) o el sulfato de cobre ($CuSO_4$) (1), para demostrar el estado de salud de los animales del ensayo (1) (6). Si no se realizan ensayos de toxicidad de referencia a intervalos regulares, se debe comprobar el lote de organismos que se vaya a utilizar en un ensayo de bioacumulación de sedimentos utilizando un tóxico de referencia. La medición del contenido en lípidos también podría proporcionar información útil sobre el estado de los animales.

*Cultivo de los organismos de ensayo*

24. Con el fin de disponer de un número suficiente de gusanos para realizar ensayos de bioacumulación, los gusanos deben conservarse en un cultivo de laboratorio de una sola especie. En el apéndice 6 se resumen los métodos de cultivo de las especies seleccionadas para el ensayo. Se pueden consultar los detalles en las referencias (8) (9) (10) (18) (28) (29) (30) (31) (32).

**Equipo**

25. Se tendrá cuidado de no utilizar, con ninguna parte del equipo, materiales que puedan disolver o adsorber la sustancia problema o lixiviar otras sustancias, o tener algún efecto adverso sobre los animales de ensayo. Pueden utilizarse cámaras normales rectangulares o cilíndricas, de materiales químicamente inertes y de una capacidad adecuada para la tasa de carga, es decir, para el número de gusanos de ensayo. Debe evitarse el uso de tubos de plástico blando para administrar agua o aire. Se debe utilizar politetrafluoroetileno, acero inoxidable o vidrio en cualquier equipo que esté en contacto con los medios del ensayo. En el caso de sustancias con elevados coeficientes de adsorción, como los piretroides sintéticos, puede ser necesario emplear vidrio silanizado. Será necesario, en estos casos, deshacerse de los equipos una vez usados (5). En lo que respecta a las sustancias marcadas radiactivamente y las sustancias volátiles, se debe tener cuidado de evitar desprendimientos y el escape de la sustancia problema desprendida. Deben utilizarse trampas (por ejemplo, frascos de lavado de gases de vidrio) que contengan absorbentes adecuados para retener los residuos que puedan evaporarse de las cámaras de ensayo (11).

**Agua**

26. El agua sobrenadante debe ser tal que permita la supervivencia de la especie de ensayo durante los periodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan ningún comportamiento ni aspecto anormales. Se recomienda utilizar agua reconstituida de acuerdo con el método de ensayo C.1 (25) como agua sobrenadante, tanto en los ensayos como en los cultivos de gusanos del laboratorio. Se ha demostrado que varias especies de ensayo pueden sobrevivir, crecer y reproducirse en esta agua (8), y se proporciona la máxima armonización de las condiciones de ensayo y de cultivo. El agua debe caracterizarse al menos por el pH, la conductividad y la dureza. El análisis de microcontaminantes en el agua antes de usarla puede proporcionar información útil (apéndice 4).

27. Durante toda la duración de un ensayo, el agua deberá tener una calidad constante. El pH del agua sobrenadante debe encontrarse entre 6 y 9. La dureza total debe encontrarse entre 90 y 400 mg de $CaCO_3$ por litro al iniciar el ensayo (7). En el método de ensayo C.1 se indican los intervalos del pH y la dureza del agua reconstituida mencionada (25). Si se sospecha

▼M6

una interacción entre los iones de dureza y la sustancia problema, debe utilizarse un agua menos dura. En el apéndice 4 se resumen otros criterios relativos al agua de dilución aceptable, de conformidad con las TG 210 de la OCDE (34).

**Sedimento**

28. La calidad del sedimento debe ser tal que permita la supervivencia y, preferentemente, la reproducción de los organismos de ensayo durante los periodos de aclimatación y de ensayo, sin que aparezcan comportamientos ni aspectos anómalos en los animales. Los gusanos deben refugiarse en el sedimento. El comportamiento excavador puede afectar a la exposición y, por consiguiente, al BAF. Por lo tanto, se debe registrar si los organismos del ensayo evitan el sedimento o si se refugian en él, cuando la turbidez del agua sobrenadante permita dichas observaciones. Los gusanos (de control y de tratamientos) deben refugiarse en el sedimento en un periodo de 24 horas a partir de su adición a los recipientes de ensayo. Si se observara la ausencia de excavación o la evasión del sedimento de forma permanente (por ejemplo, más del 20 % durante más de la mitad de la fase de absorción), esto indica que las condiciones del ensayo no son adecuadas, que los organismos del ensayo no están sanos o que la concentración de la sustancia problema provoca dicho comportamiento. En ese caso, hay que detener el ensayo y repetirlo mejorando las condiciones. Se puede obtener más información sobre la ingestión del sedimento utilizando los métodos descritos en (35) y (36), que especifican la ingestión de sedimento o la selección de partículas en los organismos de ensayo. Si se puede observar, deben registrarse, como mínimo, la presencia o la ausencia de deyecciones en la superficie del sedimento, que indican la ingestión del sedimento por parte de los gusanos, y esto debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados del ensayo con respecto a las vías de exposición.

29. Se recomienda usar un sedimento artificial basado en el suelo artificial descrito en el método de ensayo C.8 (40) tanto en los ensayos como en los cultivos de laboratorio de los gusanos (apéndice 5), ya que es posible que no haya sedimentos naturales de una calidad adecuada durante todo el año. Asimismo, pueden influir en el ensayo los organismos nativos, además de la posible presencia de microcontaminantes en los sedimentos naturales. En el sedimento artificial pueden sobrevivir, crecer y reproducirse varias especies de ensayo (8).

30. El sedimento artificial debe caracterizarse, al menos, por el origen de los componentes, la granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), el carbono orgánico total (COT), el contenido de agua y el pH. La medición del potencial de oxidorreducción es opcional. Sin embargo, los sedimentos naturales de lugares no contaminados pueden utilizarse como sedimentos de ensayo o de cultivo (1). Los sedimentos naturales deben caracterizarse, como mínimo, por su origen (lugar de recogida), pH y amoníaco del agua intersticial, carbono orgánico total (COT), granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla) y porcentaje de contenido de agua (6). También se recomienda que el sedimento natural, antes de enriquecerse con la sustancia problema, se someta durante siete días a las mismas condiciones que vayan a reinar posteriormente en el ensayo, si se espera la aparición de amoníaco. Al final de este periodo de acondicionamiento, el agua sobrenadante debe eliminarse y descartarse. El análisis del sedimento o de sus componentes para detectar microcontaminantes antes de la utilización podría aportar información útil.

*Preparación*

31. La manipulación de los sedimentos naturales antes de utilizarlos en el laboratorio se describe en (1) (6) (44). En el apéndice 5 se describe un ejemplo de preparación del sedimento artificial.

▼M6

*Almacenamiento*

32. El almacenamiento de los sedimentos naturales en el laboratorio debe ser lo más breve posible. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE. UU. (6) recomienda un periodo de almacenamiento máximo de 8 semanas a 4 ± 2 °C en la oscuridad. No debe quedar espacio libre por encima del sedimento en los recipientes de almacenamiento. En el apéndice 5 se incluyen recomendaciones relativas al almacenamiento del sedimento artificial.

**Aplicación de la sustancia problema**

33. El sedimento se enriquece con la sustancia problema. El procedimiento de enriquecimiento conlleva el recubrimiento de uno o varios de los componentes del sedimento con la sustancia problema. Por ejemplo, la arena de cuarzo, o una parte de la misma (por ejemplo, 10 g de arena de cuarzo por recipiente de ensayo), puede empaparse con una solución de la sustancia problema en un disolvente adecuado que, posteriormente, se evapora lentamente hasta secarse. La fracción recubierta puede mezclarse a continuación con el sedimento húmedo. La cantidad de arena proporcionada por la mezcla de sustancia problema y arena debe tenerse en cuenta a la hora de preparar el sedimento; es decir, el sedimento, por lo tanto, debe prepararse con menos arena (6).

34. Con un sedimento natural, la sustancia problema puede añadirse enriqueciendo una parte seca del sedimento, tal y como se ha descrito anteriormente en relación con el sedimento artificial, o bien removiendo la sustancia problema con el sedimento húmedo, con la posterior evaporación del eventual agente solubilizante utilizado. Los disolventes que pueden utilizarse para enriquecer el sedimento húmedo son el etanol, el metanol, el éter monometílico de etilenglicol, el éter dimetílico de etilenglicol, la dimetilformamida y el trietilenglicol (5) (34). Los principales criterios para la selección de un agente solubilizante adecuado deben ser la toxicidad y la volatilidad del disolvente, además de la solubilidad de la sustancia problema en el disolvente elegido. En Environment Canada (1995) (41) se ofrece más orientación sobre los procedimientos de enriquecimiento. Debe velarse por que la sustancia problema añadida al sedimento se distribuya de forma total y homogénea por el sedimento. Deben analizarse submuestras replicadas del sedimento enriquecido para comprobar las concentraciones de la sustancia problema en el sedimento, y para determinar el grado de homogeneidad de la distribución de la sustancia problema.

35. Una vez preparado con el agua sobrenadante el sedimento enriquecido, es conveniente dejar que la sustancia problema se reparta entre la fase de sedimento y la fase acuosa. Preferentemente, esto debe efectuarse en las mismas condiciones de temperatura y aireación que el ensayo. El tiempo adecuado para el equilibrado depende de la sustancia y del sedimento, y puede ser del orden de horas o de días, aunque en ciertos casos poco frecuentes puede llegar a ser de varias semanas (4 o 5 semanas) (28) (42). En este ensayo no se espera hasta llegar al equilibrio, pero se recomienda un periodo de equilibrado entre 48 horas y 7 días. En función del objetivo del estudio, por ejemplo cuando deben imitarse las condiciones ambientales, el sedimento enriquecido puede equilibrarse o envejecerse durante un periodo más largo (11).

REALIZACIÓN DEL ENSAYO

**Ensayo preliminar**

36. Puede ser útil proceder a un experimento preliminar para optimizar las condiciones de realización del ensayo definitivo como, por ejemplo, la selección de las concentraciones de la sustancia problema y la duración de las fases de absorción y de eliminación. El comportamiento de los gusanos como, por ejemplo, la evasión del sedimento, es decir, que los gusanos se

▼M6

escapen del sedimento, algo que puede ser provocado por la sustancia problema o por el sedimento en sí, debe observarse y registrarse durante un ensayo preliminar. La evasión del sedimento también se puede utilizar como parámetro subletal en un ensayo preliminar para estimar las concentraciones de la sustancia problema que deben utilizarse en un ensayo de bioacumulación.

**Condiciones de exposición**

*Duración de la fase de absorción*

37. Los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema durante la fase de absorción. La primera muestra debe tomarse entre 4 y 24 horas a partir del inicio de la fase de absorción. La fase de absorción debe durar 28 días como máximo (1) (6) (11), salvo si puede demostrarse que se alcanza antes el equilibrio. El estado estable se alcanza: i) cuando es paralelo al eje de tiempo la gráfica de los factores de bioacumulación en cada periodo de muestreo, frente al tiempo; ii) cuando tres análisis sucesivos del BAF realizados en las muestras tomadas a intervalos de dos días como mínimo no varían más de ± 20 % entre sí; y iii) cuando no hay diferencias importantes entre los tres periodos de muestreo (según las comparaciones estadísticas como, por ejemplo, el análisis de la varianza y el análisis de regresión). Si el estado estable no se alcanza en 28 días, la fase de absorción puede finalizar dando comienzo a la fase de eliminación, y el $BAF_K$ puede calcularse a partir de las constantes de las velocidades de absorción y de eliminación (véanse también los puntos 16 a 18).

*Duración de la fase de eliminación*

38. La primera muestra debe tomarse entre 4 y 24 horas a partir del inicio de la fase de eliminación, ya que pueden producirse cambios rápidos en los residuos de los tejidos durante el periodo inicial. Se recomienda poner fin a la fase de eliminación cuando la concentración de la sustancia problema sea inferior al 10 % de la concentración en estado estable, o después de una duración máxima de 10 días. El nivel de residuos en los gusanos al finalizar la fase de eliminación debe indicarse como parámetro secundario. Sin embargo, este plazo de tiempo puede regirse por el periodo durante el cual la concentración de la sustancia problema en los gusanos permanece por encima del límite de detección analítico.

**Organismos de ensayo**

*Cantidades de gusanos de ensayo*

39. El número de gusanos por muestra debe proporcionar una masa de tejido de gusanos tal que la masa de sustancia problema por muestra, al principio de la fase de absorción y al final de la fase de eliminación, sea significativamente superior al límite de detección de la sustancia problema en el material biológico. En las partes mencionadas de las fases de absorción y eliminación, la concentración en los animales de ensayo suele ser relativamente baja (6) (8) (18). Dado que el peso individual de muchas especies de oligoquetos acuáticos es muy bajo (de 5 a 10 mg de peso húmedo por individuo en lo que respecta a las especies *Lumbriculus variegatus* y *Tubifex tubifex*), los gusanos de una cámara de ensayo de replicada determinada pueden agruparse para realizar el pesaje y el análisis de la sustancia problema. En las especies de ensayo con un mayor peso individual (por ejemplo, *Branchiura sowerbyi*) se pueden utilizar réplicas que contengan un solo individuo, pero en esos casos el número de réplicas debe aumentarse a cinco por punto de muestreo (11). No obstante, cabe señalar que la especie *B. sowerbyi* no se incluyó en el ensayo interlaboratorios (12) y, por lo tanto, no se recomienda como especie preferente en el método.

40. Deben utilizarse gusanos de tamaño similar (en lo que respecta a la especie *L. variegatus*, véase el apéndice 6). Los gusanos deben tener el mismo origen y deben ser animales adultos o grandes de la misma clase de edad (véase el apéndice 6). El peso y la edad de un animal pueden afectar de forma significativa a los valores de BAF (por ejemplo, debido a la presencia de huevos o al contenido lipídico distinto); estos parámetros deben quedar registrados correctamente. Para medir el peso húmedo y seco medio, hay que pesar una submuestra de gusanos antes de iniciar el ensayo.

▼M6

41. Con las especies *Tubifex tubifex* y *Lumbriculus variegatus*, se espera que haya reproducción durante el periodo de ensayo. La ausencia de reproducción en un ensayo de bioacumulación debe quedar registrada y debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados del ensayo.

*Carga*

42. Deben utilizarse grandes proporciones sedimento/gusanos y agua/gusanos para minimizar la reducción de la concentración de la sustancia problema en el sedimento durante la fase de absorción, así como para evitar reducciones de la concentración de oxígeno disuelto. La tasa de carga seleccionada también debe corresponderse con las densidades de población naturales de las especies seleccionadas (43). Por ejemplo, en el caso de *Tubifex tubifex*, se recomienda una tasa de carga de 1 a 4 mg de tejido de gusanos (peso húmedo) por gramo de sedimento húmedo (8) (11). Las referencias (1) y (6) recomiendan una tasa de carga ≤ 1 g de peso seco de tejido de gusanos por 50 g de carbono orgánico en el sedimento para la especie *L. variegatus*.

43. Los gusanos que vayan a utilizarse en un ensayo deben extraerse del cultivo tamizando el sedimento del cultivo. Los animales (gusanos adultos o grandes sin signos de fragmentación reciente) se transfieren a placas de vidrio (por ejemplo, placas de Petri) que contengan agua limpia. Si las condiciones del ensayo son distintas a las del cultivo, una fase de aclimatación de 24 horas debería ser suficiente. Antes de pesarlos, debe eliminarse el agua sobrante de los gusanos. Esto se puede hacer colocando con cuidado los gusanos sobre una servilleta de papel previamente humedecida. No se recomienda utilizar papel absorbente para secar los gusanos, ya que esto puede provocarles estrés o daños. Brunson et al. (1998) recomiendan utilizar gusanos no secados de aproximadamente 1,33 veces la biomasa objetivo. Este 33 % adicional corresponde a la diferencia entre los gusanos secados y no secados (28).

44. Al comenzar la fase de absorción (día 0 del ensayo), los organismos del ensayo se retiran de la cámara de aclimatación y se distribuyen aleatoriamente en los recipientes (por ejemplo, placas de Petri) que contienen agua reconstituida, añadiendo grupos de dos gusanos a cada recipiente hasta que cada recipiente contenga diez gusanos. A continuación, estos grupos de gusanos se transfieren aleatoriamente a recipientes de ensayo separados, por ejemplo con unas pinzas de acero blando. Los recipientes de ensayo se incuban después en las condiciones del ensayo.

*Alimentación*

45. Teniendo en cuenta el bajo contenido en nutrientes del sedimento artificial, el sedimento debe modificarse con una fuente de alimentación. Con el fin de no subestimar la exposición de los organismos del ensayo, por ejemplo alimentándolos de forma selectiva con alimentos no contaminados, los alimentos necesarios para la reproducción y el crecimiento de los organismos del ensayo deben añadirse al sedimento una vez, antes o durante la aplicación de la sustancia problema (véase el apéndice 5).

**Proporción sedimento-agua**

46. La proporción sedimento-agua recomendada es 1:4 (45). Esta proporción se considera adecuada para mantener las concentraciones de oxígeno en los niveles adecuados, así como para evitar la acumulación de amoníaco en el agua sobrenadante. El contenido de oxígeno en el agua sobrenadante debe mantenerse ≥ 40 % de la saturación. El agua sobrenadante de los recipientes de ensayo debe airearse suavemente (por ejemplo, de dos a cuatro burbujas por segundo), con una pipeta Pasteur colocada aproximadamente a 2 cm por encima de la superficie del sedimento, de forma que se minimice la alteración del sedimento.

▼M6

**Iluminación y temperatura**

47. El fotoperiodo del cultivo y del ensayo es de 16 horas (1) (6). La intensidad de la luz en el área del ensayo debe mantenerse a unos 500-1 000 lux. La temperatura de ensayo debe ser de 20 ± 2 °C durante todo el ensayo.

**Concentraciones de ensayo**

48. Se utiliza una sola concentración de ensayo (lo más baja posible) para determinar la cinética de absorción, pero se puede utilizar una segunda concentración (más alta) [por ejemplo, (46)]. En ese caso, se toman muestras y se analizan en estado estable o después de 28 días para confirmar el BAF medido en la concentración más baja (11). La concentración más alta debe seleccionarse para poder excluir los efectos adversos (por ejemplo, seleccionando aproximadamente el 1 % de la concentración de efectos crónicos, $EC_X$, más baja que se conozca, tal y como se derive de los estudios de toxicidad crónica pertinentes). La concentración de ensayo inferior debe ser significativamente superior al límite de detección en el sedimento y en las muestras biológicas por el método analítico utilizado. Si la concentración con efecto de la sustancia problema está cerca del límite de detección analítica, se recomienda usar una sustancia problema marcada radiactivamente con una radiactividad específica alta.

**Réplicas tratadas y de control**

49. El número mínimo de réplicas tratadas para realizar las mediciones cinéticas debe ser de tres por punto de muestreo (11) durante las fases de absorción y eliminación. Deben utilizarse réplicas adicionales, por ejemplo para otras fechas de muestreo opcionales. En lo que respecta a la fase de eliminación, se prepara un número correspondiente de réplicas con un sedimento no enriquecido y agua sobrenadante, de forma que los gusanos tratados puedan transferirse de los recipientes tratados designados a los recipientes no tratados al final de la fase de absorción. El número total de réplicas tratadas debe ser suficiente tanto en la fase de absorción como en la de eliminación.

50. Por otra parte, los gusanos designados para el muestreo durante la fase de eliminación pueden exponerse en un único recipiente grande que contenga sedimento enriquecido del mismo lote que el utilizado en la cinética de absorción. Debe demostrarse que las condiciones del ensayo (por ejemplo, profundidad del sedimento, proporción sedimento-agua, carga, temperatura, calidad del agua) son comparables a las de las réplicas designadas para la fase de absorción. Al final de la fase de absorción, deben tomarse muestras de gusanos, agua y sedimento de este recipiente para su análisis, y debe extraerse, con cuidado, un número suficiente de gusanos grandes que no presenten signos de fragmentación reciente para transferirlos a las réplicas preparadas para la fase de eliminación (por ejemplo, diez organismos por recipiente replicado).

51. Si no se utiliza otro disolvente que no sea el agua, deben proporcionarse al menos nueve réplicas de un control negativo (al menos tres muestreadas al principio, tres al final de la absorción y tres al final de la eliminación) para realizar análisis biológicos y de referencia. Si se utiliza algún agente solubilizante para aplicar la sustancia problema, debe realizarse un control de disolvente (deben muestrearse al menos tres réplicas al principio, tres al final de la fase de absorción y tres al final de la fase de eliminación). En ese caso, deben proporcionarse al menos cuatro réplicas de un control negativo (sin disolvente) para el muestreo al final de la fase de absorción. Estas réplicas pueden compararse biológicamente con el control de disolvente para obtener información en cuanto a una posible influencia del disolvente sobre los organismos de ensayo. En el apéndice 3 pueden consultarse los detalles.

▼M6

**Frecuencia de las mediciones de la calidad del agua**

52. Como mínimo, deben medirse los siguientes parámetros de calidad del agua en el agua sobrenadante durante la fase de absorción y la fase de eliminación:

| | |
|---|---|
| Temperatura | En un recipiente de cada nivel de tratamiento por fecha de muestreo, y en un recipiente de control una vez a la semana y al inicio y al final del periodo de absorción y de eliminación; también se puede registrar la temperatura en el medio circundante (aire ambiente o baño de agua), o en un recipiente de ensayo representativo, por ejemplo de forma continua o cada hora. |
| Contenido de oxígeno disuelto | En un recipiente de cada nivel de tratamiento y en un recipiente de control por fecha de muestreo; expresado como mg/l y % de ASV (valor de saturación de aire). |
| Suministro de aire | Se controla al menos una vez al día (días hábiles) y se ajusta en caso necesario. |
| pH | En un recipiente tratado de cada nivel de tratamiento por fecha de muestreo, y en un recipiente de control una vez a la semana y al principio y al final del periodo de absorción y de eliminación. |
| Dureza total del agua | Al menos en un recipiente tratado y en un recipiente de ensayo de control al principio y al final del periodo de absorción y de eliminación; se expresa como mg/l de $CaCO_3$. |
| Contenido total de amoníaco | Al menos en un recipiente tratado y en un recipiente de ensayo de control al principio y al final del periodo de absorción y de eliminación; se expresa como mg/l de $NH_4^+$, $NH_3$ o N amoniacal total. |

**Muestreo y análisis de gusanos, sedimento y agua**

*Calendario de muestreo*

53. En el apéndice 3 figuran ejemplos de calendarios de muestreo con una fase de absorción de 28 días y una fase de eliminación de 10 días.

54. Se toman muestras del agua y del sedimento de las cámaras de ensayo para determinar la concentración de la sustancia problema antes de introducir los gusanos, y durante las fases de absorción y de eliminación. Durante el ensayo se determinan las concentraciones de la sustancia problema en los gusanos, el sedimento y el agua para controlar la distribución de las sustancia problema en los compartimentos del sistema de ensayo.

55. Se deben recoger muestras de gusanos, sedimento y agua al menos en seis ocasiones, durante tanto la fase de absorción como la de eliminación.

56. Hay que continuar con el muestreo hasta que se haya alcanzado una meseta (estado estable) (véase el apéndice 1) o durante 28 días. Si no se hubiera alcanzado el nivel de meseta en 28 días, se debe dar comienzo a la fase de eliminación. Cuando se inicie la fase de eliminación, hay que transferir los gusanos designados a cámaras replicadas que contengan sedimento no tratado y agua (véanse también los puntos 17 y 18).

*Muestreo y preparación de las muestras*

57. Las muestras de agua se obtienen por decantación, extracción con sifón o pipeteo de un volumen suficiente para medir la cantidad de sustancia problema en la muestra.

58. El agua sobrenadante restante se decanta o se extrae con sifón cuidadosamente de las cámaras de ensayo. Las muestras de sedimento deben tomarse con cuidado para provocar la mínima alteración a los gusanos.

▼M6

59. Retire todos los gusanos de la réplica de ensayo en el momento del muestreo, por ejemplo mediante la suspensión del sedimento con el agua sobrenadante y la extensión del contenido de cada réplica en una bandeja poco profunda para retirar los gusanos con unas pinzas de acero blando. Enjuague los gusanos rápidamente con agua en un vaso poco profundo o una bandeja de acero. Elimine el exceso de agua. Transfiera los gusanos con cuidado a un recipiente previamente pesado y pese los gusanos. Sacrifique los gusanos por congelación (por ejemplo, ≤ – 18 °C). La presencia y el número de capullos y juveniles deben quedar registrados.

60. En general, los gusanos deben pesarse y sacrificarse inmediatamente después del muestreo, sin fase de purga intestinal, para obtener un BAF prudente que incluya el contenido intestinal contaminado, así como para evitar pérdidas de residuos corporales durante un eventual periodo de purga intestinal en agua (8). No se prevé la eliminación significativa de las sustancias con un log $K_{ow}$ superior a 5 durante el eventual periodo de purga intestinal solo en agua, mientras que las sustancias con log $K_{ow}$ inferior a 4 pueden perderse en cantidades importantes (47).

61. Durante la fase de eliminación, los gusanos vacían el intestino en el sedimento limpio. Esto significa que las mediciones realizadas justo antes de la fase de eliminación incluyen contenidos intestinales contaminados, mientras que después del periodo inicial de 4 a 24 horas de la fase de eliminación se supone que la mayor parte del contenido intestinal contaminado ha sido reemplazado por sedimento limpio (11) (47). En ese caso, la concentración en los gusanos de esta muestra puede considerarse la concentración de tejido después de la purga intestinal. Para tener en cuenta la dilución de la concentración de la sustancia problema por el sedimento no contaminado durante la fase de eliminación, es posible estimar el peso del contenido intestinal a partir de la relación entre el peso húmedo de los gusanos y el peso de las cenizas de los gusanos, o de la relación entre el peso seco de los gusanos y el peso de las cenizas de los gusanos.

62. Si la finalidad de un estudio concreto es medir la biodisponibilidad y los verdaderos residuos de tejidos en los organismos de ensayo, en ese caso se debe pesar, purgar en agua limpia durante un periodo de 6 horas (47) y pesar de nuevo antes del análisis al menos una submuestra de animales tratados (por ejemplo, procedentes de tres recipientes replicados adicionales). A continuación se pueden comparar los datos relativos al peso y a la concentración corporal de los gusanos de esta submuestra con los valores obtenidos de gusanos no purgados. Los gusanos designados para medir la eliminación no deben purgarse antes de su traslado a un sedimento limpio para minimizar el estrés adicional en los animales.

63. Es preferible analizar de inmediato, después de extraerlas (es decir, en uno o dos días), las muestras de agua, sedimento y gusanos para evitar la degradación u otras pérdidas y para calcular las tasas aproximadas de absorción y eliminación, conforme se vaya desarrollando el ensayo. El análisis inmediato evita también retrasos en la determinación del momento en que se alcanza una meseta.

64. A falta de análisis inmediato, las muestras deben conservarse en condiciones adecuadas. Se debe obtener información sobre la estabilidad y las condiciones de conservación adecuadas para la sustancia problema en cuestión antes de empezar el estudio (por ejemplo, duración y temperatura de conservación, procedimientos de extracción, etc.). Si dicha información no estuviera disponible y se considerara necesaria, se podría trabajar al mismo tiempo con tejidos de control enriquecidos para determinar la estabilidad de la conservación.

*Calidad del método analítico*

65. Como la totalidad del procedimiento se rige principalmente por la exactitud, la precisión y la sensibilidad del método analítico utilizado para la sustancia problema, es necesario comprobar experimentalmente que la precisión y la reproducibilidad del análisis químico, así como la recuperación de la sustancia problema en las muestras de agua, sedimento y gusanos son satisfactorias

▼M6

para este método en cuestión. Asimismo, se debe comprobar que la sustancia problema no se pueda detectar en las cámaras de control en concentraciones superiores a las de referencia. En caso necesario, hay que corregir los valores de $C_w$, $C_s$ y $C_a$ en relación con los valores de recuperación y referencia de los controles. Las muestras se deben manipular durante todo el ensayo de forma que se minimicen la contaminación y las pérdidas (por ejemplo, las resultantes de la adsorción de la sustancia problema en el dispositivo de muestreo).

66. Deben registrarse y notificarse la recuperación general y la recuperación de la sustancia problema en gusanos, sedimentos, agua y, si se hubieran utilizado, en las trampas que contengan absorbentes para retener la sustancia problema evaporada.

67. Como se recomienda el uso de sustancias marcadas radiactivamente, se puede analizar la radiactividad total (es decir, la de la sustancia original y la de los productos de degradación). Sin embargo, si fuera viable analíticamente, la cuantificación de la sustancia original y de los productos de degradación en estado estable o al final de la fase de absorción podría proporcionar información importante. Si se ha previsto realizar dichas mediciones, las muestras deben someterse, a continuación, a unos procedimientos de extracción adecuados, de forma que la sustancia original pueda cuantificarse por separado. Cuando un producto de degradación detectado represente un porcentaje significativo (por ejemplo, más del 10 %) de la radiactividad medida en los organismos de ensayo en estado estable o al final de la fase de absorción, se recomienda identificar dichos productos de degradación (5).

68. Debido a la biomasa individual baja, no suele ser posible determinar la concentración de la sustancia problema en cada gusano individual, a menos que se utilice la especie *Branchiura sowerbyi* (40-50 mg de peso húmedo por gusano) como especie de ensayo (11). Por lo tanto, se acepta la agrupación de los individuos muestreados de un recipiente de ensayo determinado, pero esto limita los procedimientos estadísticos que pueden aplicarse a los datos. Si una potencia y un procedimiento estadísticos específicos constituyen aspectos importantes, debe incluirse en el ensayo un número adecuado de animales de ensayo o de cámaras de ensayo replicadas para dar cabida al agrupamiento, al procedimiento y a la potencia que se desean.

69. Se recomienda expresar el BAF en función del peso húmedo total y del peso seco total, y, cuando resulte necesario (por ejemplo, con las sustancias muy lipofílicas), en función del contenido lipídico y del COT del sedimento. Deben utilizarse métodos adecuados para determinar el contenido lipídico (48) (49). Se puede recomendar la técnica de extracción por cloroformo/metanol (50) como método estándar (48). Sin embargo, para evitar el uso de disolventes clorados debe utilizarse una modificación validada en un estudio interlaboratorios del método de Bligh y Dyer (50), como se describe en (51). Como los diversos métodos pueden no dar valores idénticos (48), es importante precisar bien el método utilizado. Cuando sea posible (es decir, si se dispone de suficiente tejido de gusanos), el contenido lipídico se mide en la misma muestra o el mismo extracto que se haya utilizado para el análisis de la sustancia problema, puesto que los lípidos deben, a menudo, retirarse del extracto antes de que este se pueda analizar por cromatografía (5). No obstante, resulta práctico utilizar animales de control aclimatados, por lo menos al principio o, preferiblemente, al final de la fase de absorción, para medir el contenido lipídico, por ejemplo en tres muestras.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

70. La curva de absorción de la sustancia problema se obtiene representando en escala aritmética la concentración de la sustancia problema en el interior o en

▼M6

la superficie de los gusanos durante la fase de absorción frente al tiempo. Si la curva alcanza una meseta, se debe calcular el $BAF_{ss}$ de estado estable:

$$\frac{C_a \text{ en estado estable o el día 28 (media)}}{C_s \text{ en estado estable o el día 28 (media)}}$$

71. Determine el factor de acumulación cinética (BAFK) como la relación ks/ke. La constante de eliminación (ke) se calcula normalmente a partir de la curva de eliminación (es decir, la gráfica de la concentración de la sustancia problema en los gusanos durante la fase de eliminación). A continuación se calcula la constante de la velocidad de absorción (ks) a partir de la cinética de la curva de absorción. Para obtener el BAFK y las constantes de velocidad, ks y ke, se utilizarán preferiblemente métodos informáticos de estimación de parámetros no lineales (véase el apéndice 2). En caso de que la eliminación claramente no sea de primer orden, será necesario emplear otros modelos más complejos (25) (27) (52).

72. El factor de acumulación biota-sedimento (BSAF) se determina normalizando el BAFK para tener en cuenta el contenido lipídico de los gusanos y el contenido de carbono orgánico total en el sedimento.

**Interpretación de los resultados**

73. Los resultados se interpretarán con precaución cuando las concentraciones medidas de las concentraciones de ensayo se encuentren en niveles cercanos al límite de detección del método de análisis utilizado.

74. Unas curvas de absorción y de eliminación claramente definidas indican la buena calidad de los datos de bioacumulación. Por lo general, los límites de confianza de los valores de BAF obtenidos en estudios con un diseño adecuado no deben superar el 25 % (5).

**Informe del ensayo**

75. El informe del ensayo incluirá la información siguiente:

*Sustancia problema:*

— naturaleza física y propiedades fisicoquímicas como, por ejemplo, log $K_{ow}$ o hidrosolubilidad;

— datos de identificación química; origen de la sustancia problema, identidad y concentración de los eventuales disolventes utilizados;

— si estuvieran marcados radiactivamente, la posición precisa de los átomos marcados, la radiactividad específica y el porcentaje de radiactividad asociado a las impurezas.

*Especies de ensayo:*

— denominación científica, cepa, fuente, eventuales tratamientos previos, aclimatación, edad, rango de tamaños, etc.

*Condiciones de ensayo:*

— procedimiento de ensayo aplicado (por ejemplo, estático, semiestático o dinámico);

— tipo y características de la iluminación y del fotoperiodo o fotoperiodos utilizados;

— diseño del ensayo [por ejemplo, número, material y tamaño de las cámaras de ensayo, volumen de agua, masa y volumen del sedimento, tasa de sustitución del volumen de agua (en los procedimientos dinámicos o semiestáticos), eventual aireación utilizada antes y durante el ensayo, número de réplicas, número de gusanos por réplica, número de concentraciones de ensayo, duración de las fases de absorción y de eliminación, frecuencia de muestreo];

▼M6

— método de preparación y aplicación de la sustancia problema, así como los motivos para elegir un método específico;

— concentraciones de ensayo nominales;

— origen de los componentes del agua artificial y del sedimento o, si se utilizaran medios naturales, origen del agua y del sedimento, descripción del eventual tratamiento previo, resultados de la posible demostración de la capacidad de los animales de ensayo para vivir o reproducirse en los medios utilizados, características del sedimento [pH y amoníaco del agua intersticial, en los sedimentos naturales), carbono orgánico total (COT), granulometría (porcentaje de arena, limo y arcilla), porcentaje del contenido de agua y cualesquiera otras mediciones realizadas]; y características del agua [pH, dureza, conductividad, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, niveles de cloro residuales (si se hubieran medido) y cualquier otra medición realizada];

— peso nominal y peso seco medido en porcentaje de peso húmedo (o relación entre el peso seco y el peso húmedo) del sedimento artificial, el peso seco medido en porcentaje de peso húmedo (o relación entre el peso seco y el peso húmedo) en los sedimentos de campo;

— calidad del agua en las cámaras de ensayo, caracterizada por su temperatura, pH, amonio, dureza total y concentración de oxígeno disuelto;

— información pormenorizada sobre el tratamiento de las muestras de agua, sedimento y gusanos, incluidos los datos de preparación, conservación, procedimientos de enriquecimiento, extracción y procedimientos (y precisión) del análisis de la sustancia problema y del contenido lipídico, y recuperaciones de la sustancia problema.

*Resultados*

— mortalidad de los gusanos de control y los gusanos de cada cámara de ensayo, y cualquier efecto subletal observado, incluyendo el comportamiento anómalo (por ejemplo, evasión del sedimento, presencia o ausencia de deyecciones, falta de reproducción);

— peso seco medido en porcentaje de peso húmedo (o relación entre el peso seco y el peso húmedo) del sedimento y de los organismos problema (resulta útil para la normalización);

— contenido lipídico de los gusanos;

— curvas que indiquen las cinéticas de absorción y de eliminación de la sustancia problema en los gusanos y el tiempo hasta alcanzar el estado estable;

— $C_a$, $C_s$ y $C_w$ (con la desviación típica y el rango, si procede) de todos los tiempos de muestreo ($C_a$ expresada en g $kg^{-1}$ del peso húmedo y seco de todo el cuerpo; $C_s$ expresada en g $kg^{-1}$ del peso húmedo y seco del sedimento; y $C_w$ en mg $l^{-1}$). Si se necesita conocer el factor de acumulación biota-sedimento (BSAF, véase la definición en el apéndice 1), por ejemplo para poder comparar los resultados de dos o más ensayos realizados con animales de diferente contenido lipídico, $C_a$ debe expresarse además en g $kg^{-1}$ de contenido lipídico del organismo, y $C_s$ debe expresarse en g $kg^{-1}$ de carbono orgánico (CO) del sedimento;

— pueden indicarse también el BAF (expresado en kg de sedimento húmedo $kg^{-1}$ de gusanos mojados), la constante de la velocidad de absorción del sedimento $k_s$ (expresada en g de sedimento húmedo $kg^{-1}$ de gusanos húmedos $d^{-1}$), y la constante de la velocidad de eliminación $k_e$ (expresada en $d^{-1}$); y el BSAF (expresado en kg de CO en el sedimento $kg^{-1}$ de contenido lipídico de los gusanos);

▼**M6**

— residuos no eliminados (NER) al final de la fase de eliminación;

— si se miden, los porcentajes de la sustancia original, productos de degradación y residuos ligados (es decir, el porcentaje de la sustancia problema que no se pueda extraer con métodos de extracción habituales) detectados en los animales de ensayo;

— métodos utilizados para realizar los análisis estadísticos de los datos.

*Evaluación de resultados*

— cumplimiento por los resultados de los criterios de validez recogidos en el punto 21;

— resultados inesperados o poco habituales como, por ejemplo, eliminación incompleta de la sustancia problema de los animales de ensayo; en esos casos, los resultados de los eventuales estudios preliminares pueden proporcionar información útil.

▼M6

*Apéndice 1*

**Definiciones y unidades**

**Sedimento artificial** (o sedimento reconstituido, formulado o sintético): mezcla de materiales empleada para imitar los componentes físicos de un sedimento natural.

**Bioacumulación:** aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo respecto a la concentración de esta sustancia en el medio circundante. La bioacumulación es el resultado de procesos tanto de bioconcentración como de biomagnificación (véase más abajo).

El **factor de bioacumulación** (BAF) en cualquier momento de la fase de absorción de este ensayo de bioacumulación es la concentración de la sustancia problema en la superficie o en el interior del organismo de ensayo ($C_a$ en $g \cdot kg^{-1}$ de peso seco o húmedo) dividida por la concentración de la sustancia en el medio circundante ($C_s$ en $g \cdot kg^{-1}$ de peso seco o húmedo de sedimento). Con el fin de hacer referencia a las unidades de $C_a$ y $C_s$, el BAF contiene las unidades de kg de sedimento $kg^{-1}$ de los gusanos (15).

**Factores de bioacumulación:** se calculan directamente a partir de la proporción de la constante de la velocidad de absorción de sedimento dividida por la constante de la velocidad de eliminación [$k_s$ y $k_e$, respectivamente (véase más abajo)] y se denominan factor de bioacumulación cinética ($BAF_K$).

**Bioconcentración:** es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo, derivado exclusivamente de la absorción a través de la superficie corporal, respecto a la concentración de la sustancia problema en el medio circundante.

**Biomagnificación:** es el aumento de la concentración de la sustancia problema en el interior o en la superficie de un organismo derivado principalmente de la absorción a través de comida o presas contaminadas, respecto a la concentración de esta sustancia problema en la comida o en la presa. La biomagnificación puede provocar la transferencia o la acumulación de la sustancia problema dentro de las redes alimentarias.

El **factor de acumulación biota-sedimento** (BSAF) es la concentración, normalizada teniendo en cuenta los lípidos, de la sustancia problema en la superficie o en el interior del organismo de ensayo en el estado estable dividida entre la concentración, normalizada teniendo en cuenta el carbono orgánico, de la sustancia en el sedimento en el estado estable. $C_a$, en ese caso, se expresa como g $kg^{-1}$ de contenido lipídico del organismo; y $C_s$ se expresa como g $kg^{-1}$ de contenido orgánico del sedimento.

El **periodo de acondicionamiento** se utiliza para estabilizar el componente microbiano del sedimento y eliminar, por ejemplo, el amoníaco derivado de los componentes del sedimento; tiene lugar antes de enriquecer el sedimento con la sustancia problema. Por lo general, el agua sobrenadante se descarta después del acondicionamiento.

La **eliminación** de una sustancia problema es la pérdida de esta sustancia por parte del tejido del organismo de ensayo mediante procesos activos o pasivos que se producen independientemente de la presencia o ausencia de la sustancia problema en el medio circundante.

La **fase de eliminación** es el tiempo, tras la transferencia de los organismos de ensayo desde un medio contaminado a un medio exento de la sustancia problema, durante el cual se estudia la eliminación (o la pérdida neta) de la sustancia por los organismos de ensayo.

La **constante de la velocidad de eliminación** ($k_e$) es el valor numérico que define la velocidad de reducción de la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo, tras la transferencia de los organismos de ensayo desde un medio que contiene la sustancia problema a un medio exento de ella; $k_e$ se expresa en $d^{-1}$.

▼**M6**

El **periodo de equilibrado** se utiliza para permitir la distribución de la sustancia problema entre la fase sólida, el agua intersticial y el agua sobrenadante; tiene lugar después de enriquecer el sedimento con la sustancia problema y antes de añadir los organismos de ensayo.

El **coeficiente de reparto octanol-agua** ($K_{ow}$) es la relación entre la solubilidad de una sustancia en n-octanol y en agua, en equilibrio; también se expresa en ocasiones como $P_{ow}$. El logaritmo de $K_{ow}$ ($\log K_{ow}$) se utiliza como indicación del potencial de bioacumulación de una sustancia por los organismos acuáticos.

El **coeficiente de reparto carbono orgánico — agua** ($K_{oc}$) es la relación de la concentración de una sustancia en la fracción de carbono orgánico de un sedimento respecto a su concentración en el agua, en equilibrio.

**Agua sobrenadante:** es el agua situada encima del sedimento en el recipiente de ensayo.

Una **meseta** o el **estado estable** se define como el equilibrio entre los procesos de absorción y de eliminación que se dan simultáneamente durante la fase de exposición. El estado estable se alcanza en la representación gráfica del BAF de cada periodo de muestreo con respecto al tiempo, cuando la curva se hace paralela al eje del tiempo y tres análisis sucesivos del BAF realizados con muestras tomadas a intervalos de, al menos, dos días, presentan una diferencia máxima de ± 20 % entre sí, y no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres puntos temporales de muestreo. Si las sustancias problema se absorben con lentitud, es más apropiado que los intervalos sean de siete días (5).

**Agua intersticial:** es el agua que ocupa el espacio entre las partículas del sedimento o del suelo.

La **constante de la velocidad de absorción del sedimento** ($k_s$) es el valor numérico que define la velocidad del aumento de la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo, procedente de la absorción del sedimento. $k_s$ se expresa en g de sedimento $kg^{-1}$ de gusanos $d^{-1}$.

**Sedimento enriquecido:** sedimento al que se ha añadido la sustancia problema.

El **factor de bioacumulación en el estado estable** ($BAF_{ss}$) es el BAF en dicho estado y no cambia significativamente a lo largo de un periodo prolongado, durante el cual se mantiene constante la concentración de la sustancia problema en el medio circundante ($C_s$ en g $kg^{-1}$ de peso húmedo o seco del sedimento).

La **fase de absorción o de exposición** es el tiempo durante el cual los organismos de ensayo se exponen a la sustancia problema.

▼M6

*Apéndice 2*

**Cálculo de los parámetros de absorción y de eliminación**

El parámetro principal del ensayo de bioacumulación es el factor de bioacumulación, el BAF. El BAF medido puede calcularse dividiendo la concentración de la sustancia problema en el organismo de ensayo, $C_a$, entre la concentración de la sustancia problema en el sedimento, $C_s$, en estado estable. Si el estado estable no se alcanza durante la fase de absorción, el BAF se calculará de la misma forma en el día 28. Sin embargo, ha de señalarse si el BAF se basa o no en las concentraciones en el estado estable.

El medio preferido para obtener el factor de bioacumulación cinética ($BAF_K$), la constante de velocidad de absorción del sedimento ($k_s$) y la constante de la velocidad de eliminación ($k_e$) consiste en utilizar métodos de estimación de parámetros no lineales con un ordenador. Dada la serie temporal de los factores de acumulación media ($C_a$, valores medios de cada fecha de muestreo/$C_s$, valores medios de cada fecha de muestreo = AF) de la fase de absorción según el peso húmedo de los gusanos y del sedimento, y la ecuación modelo

$$AF(t) = BAF \times (1 - e^{ke \times t}) \qquad \text{[ecuación 1]}$$

donde AF(t) es la relación entre la concentración de la sustancia problema en los gusanos y su concentración en el sedimento en un momento determinado (t) de la fase de absorción, estos programas informáticos calculan los valores de $BAF_K$, $k_s$ y $k_e$.

Cuando se alcanza el estado estable durante la fase de absorción (es decir, $t = \infty$), la ecuación 1 se puede reducir a:

$$BAF_K = \frac{k_s}{k_e} \qquad \text{[ecuación 2]}$$

donde

$k_s$ = constante de la velocidad de absorción en el tejido [g de sedimento $kg^{-1}$ de los gusanos $d^{-1}$]

$k_e$ = constante de la velocidad de eliminación [$d^{-1}$]

Entonces, $k_s/k_e \times C_s$ es una aproximación a la concentración de la sustancia problema en el tejido de los gusanos en el estado estable ($C_{a,ss}$).

El factor de acumulación biota-sedimento (BSAF) debe calcularse de la forma siguiente:

$$BSAF = BAF_K \times \frac{f_{oc}}{f_{lip}}$$

donde foc es la fracción de carbono orgánico del sedimento en peso seco, y flip es la fracción de lípidos de los gusanos, en peso seco o en peso húmedo.

Dada una serie temporal de valores de concentración, se puede modelar la cinética de eliminación con las siguientes ecuaciones modelo y un método de estimación de parámetros no lineales basado en cálculos informáticos.

Se recomienda como punto de inicio predeterminado el residuo corporal medio medido al final de la fase de absorción. El valor modelado o estimado a partir de la fase de absorción solo debe utilizarse, por ejemplo, si el valor medido se desvía de forma significativa del residuo de cuerpo modelado. En el punto 50 se puede consultar otra exposición previa de gusanos destinados a la eliminación; con este planteamiento, se cree que las muestras de estos gusanos previamente expuestos el día 0 de la fase de eliminación proporcionan un residuo corporal realista para iniciar con él la cinética de eliminación.

▼M6

Si la representación de los datos frente al tiempo indica un declive exponencial constante de la concentración de la sustancia problema en los animales, puede utilizarse un modelo monocompartimental (ecuación 4) para describir la evolución temporal de la eliminación.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \qquad \text{[ecuación 3]}$$

Los procesos de eliminación a veces resultan bifásicos, con un rápido declive de $C_a$ durante las primeras etapas, que luego se convierte en una pérdida más lenta de la sustancia problema en las fases posteriores de la eliminación [véanse, por ejemplo, (8) (19) (25)]. Las dos fases pueden interpretarse bajo la suposición de que hay dos compartimentos diferentes en el organismo, desde los que se pierde la sustancia problema a diferentes velocidades. En estos casos hay que consultar la bibliografía específica, como, por ejemplo (15) (16) (17) (25).

Por ejemplo, la ecuación siguiente (25) describe una eliminación bicompartimental:

$$C_a = A \times e^{-k_a \times t} + B \times e^{k_b \times t} \qquad \text{[ecuación 4]}$$

A y B representan el tamaño de los compartimentos (en porcentaje de residuo de tejido total), donde A es el compartimento de pérdida rápida de la sustancia y B el compartimento de pérdida lenta de la sustancia problema. La suma de A y B es igual al 100 % de todo el volumen de los compartimentos de los animales en estado estable. $k_a$ y $k_b$ representan las constantes de eliminación correspondientes [$d^{-1}$]. Si el modelo bicompartimental se aplica a los datos de depuración, la constante de la velocidad de absorción $k_s$ puede determinarse de la siguiente manera (53) (54):

$$k_s = \frac{(A \times k_a + B \times k_b) \times BAF}{A + B} \qquad \text{[ecuación 5]}$$

Sin embargo, estas ecuaciones modelo deben utilizarse con precaución, especialmente cuando se producen cambios en la biodisponibilidad de la sustancia problema durante el ensayo (42).

Como alternativa a las ecuaciones modelo anteriores, también se pueden calcular las constantes cinéticas ($k_s$ y $k_e$) de una sola vez aplicando el modelo de cinética de primer orden a todos los datos de las fases tanto de absorción como de eliminación juntos. Para encontrar una descripción de un método que permita este cálculo combinado de las constantes de velocidad de absorción y de eliminación, pueden consultarse las referencias (55) (56) y (57).

Los residuos no eliminados (NER) deben calcularse como parámetro secundario, multiplicando por 100 la relación entre la concentración media en los gusanos ($C_a$) el día 10 de la fase de eliminación y la concentración media en los gusanos ($C_a$) en estado estable (día 28 de la fase de absorción):

$$\boldsymbol{NER_{10d}[\%] = \frac{C_a \text{ al final de la eliminación}(media) \times 100}{C_a \text{ en estado estable}(media)}}$$

▼M6

*Apéndice 3*

**Ejemplo de calendario de muestreo de un ensayo de bioacumulación de 28 días**

a) **Fase de absorción (incluida una fase de equilibrado de cuatro días)**

| Día | Actividades |
|---|---|
| – 6 | Preparación de la suspensión de turba para el sedimento; acondicionamiento de la suspensión durante 48 horas. |
| – 4 | Enriquecimiento del sedimento o de la fracción del sedimento; mezcla de todos los componentes del sedimento; toma de muestras del sedimento tratado y del de control de disolventes para determinar la concentración del objeto del ensayo; adición de agua sobrenadante; incubación en las condiciones del ensayo (fase de equilibrado). |
| – 3/– 2 | Separación de los organismos de ensayo del cultivo para aclimatación. |
| 0 | Medición de la calidad del agua (véase el punto 52); extracción de réplicas para tomar muestras de agua y sedimento para determinar la concentración de la sustancia problema; distribución aleatoria de los gusanos en las cámaras de ensayo; retención de suficientes submuestras de gusanos para determinar los valores analíticos de referencia; control del suministro de aire, si se utilizara un sistema de ensayo cerrado. |
| 1 | Extracción de las réplicas para el muestreo; control del suministro de aire, comportamiento de los gusanos, calidad del agua (véase el punto 56); toma de muestras de agua, sedimento y gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema. |
| 2 | Control del suministro de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura. |
| 3 | Como el día 1. |
| 4 - 6 | Como el día 2. |
| 7 | Como el día 1; compensar el agua evaporada en caso necesario. |
| 8 - 13 | Como el día 2. |
| 14 | Como el día 1; compensar el agua evaporada en caso necesario. |
| 15 - 20 | Como el día 2. |
| 21 | Como el día 1; compensar el agua evaporada en caso necesario. |
| 22 - 27 | Como el día 2. |
| 28 | Como el día 1; medición de la calidad del agua (véase el punto 52); fin de la fase de absorción; retención de suficientes submuestras de gusanos para determinar los valores analíticos de referencia, el peso húmedo y seco y el contenido lipídico; transferencia de los gusanos desde las réplicas expuestas restantes a los recipientes que contienen sedimento limpio para la fase de eliminación (sin purga intestinal); muestreo de agua, sedimento y gusanos de los controles de disolvente; muestreo de las soluciones trampa, si se hubieran instalado. |
| | Las actividades previas a la exposición (fase de equilibrado) deben programarse teniendo en cuenta las propiedades de la sustancia problema. Si es necesario, hay que acondicionar el sedimento preparado bajo agua sobrenadante a 20 ± 2 °C durante 7 días; en este caso, ¡hay que preparar antes el sedimento! |
| | Las actividades descritas para el día 2 deben realizarse diariamente (al menos en los días hábiles). |

▼**M6**

b) **Fase de eliminación**

| Día | Actividades |
|---|---|
| -6 | Preparación de la suspensión de turba para el sedimento; acondicionamiento de la suspensión durante 48 horas. |
| -4 | Mezcla de todos los componentes del sedimento; toma de muestras del sedimento tratado y del de control de disolventes para determinar la concentración del objeto del ensayo; adición de agua sobrenadante; incubación en las condiciones del ensayo. |
| 0 (día 28 de la fase de absorción) | Medición de la calidad del agua (véase el punto 52); transferencia de los gusanos desde las réplicas expuestas restantes a los recipientes que contienen sedimento limpio; una vez transcurridas de **4 a 6 h**, extracción de las réplicas para tomar muestras de agua, sedimento y gusanos, para determinar la concentración de la sustancia problema; distribución aleatoria de los gusanos en las cámaras de ensayo. |
| 1 | Extracción de las réplicas para el muestreo; control del suministro de aire, comportamiento de los gusanos, calidad del agua (véase el punto 52); toma de muestras de agua, sedimento y gusanos para determinar la concentración de la sustancia problema. |
| 2 | Control del suministro de aire, del comportamiento de los gusanos y de la temperatura. |
| 3 | Como el día 1. |
| 4 | Como el día 2. |
| 5 | Como el día 1. |
| 6 | Como el día 2. |
| 7 | Como el día 1; compensar el agua evaporada en caso necesario. |
| 8 — 9 | Como el día 2. |
| 10 | Como el día 1; fin de la fase de eliminación; medición de la calidad del agua (véase el punto 52); muestreo de agua, sedimento y gusanos de los controles de disolvente; muestreo de las soluciones trampa, si se hubieran instalado. |
| | La preparación del sedimento antes del inicio de la fase de eliminación debe hacerse de la misma forma que antes de la fase de absorción. |
| | Las actividades descritas para el día 2 deben realizarse diariamente (al menos en los días hábiles). |

▼M6

*Apéndice 4*

**Algunas características fisicoquímicas de un agua de dilución aceptable**

| COMPONENTE | CONCENTRACIÓN |
|---|---|
| Partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 µg/l |
| Amoníaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

COMPOSICIÓN DEL AGUA RECONSTITUIDA RECOMENDADA

a) Solución de cloruro de calcio

Disuelva 11,76 g de $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ en agua desionizada; enrase a 1 l con agua desionizada.

b) Solución de sulfato de magnesio

Disuelva 4,93 g de $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ en agua desionizada; enrase a 1 l con agua desionizada.

c) Solución de bicarbonato de sodio

Disuelva 2,59 g de $NaHCO_3$ en agua desionizada; enrase a 1 l con agua desionizada.

d) Solución de cloruro de potasio

Disuelva 0,23 g de KCl en agua desionizada; enrase a 1 l con agua desionizada.

Todas las sustancias deben ser de grado analítico.

La conductividad del agua destilada o desionizada no debe superar los 10 $\mu Scm^{-1}$.

Se mezclan 25 ml de cada solución, de la a) hasta la d), y se enrasa a 1 l con agua desionizada. La suma de los iones de calcio y magnesio de estas soluciones es 2,5 mmol/l.

La proporción de iones de Ca:Mg es 4:1; la proporción de iones de Na:K es 10:1. La alcalinidad o capacidad de ácido $K_{S4.3}$ de esta solución es de 0,8 mmol/l.

Hay que airear el agua de dilución hasta lograr la saturación de oxígeno; a continuación, debe conservarse durante dos días aproximadamente sin volver a airearla antes de usarla.

El pH de un agua de dilución aceptable debe encontrarse en un intervalo de 6 a 9.

▼M6

*Apéndice 5*

**Sedimento artificial: recomendaciones sobre su preparación y almacenamiento**

A diferencia de los requisitos del método de ensayo C.8 (40), se recomienda que el contenido de turba del sedimento artificial sea del 2 % en lugar del 10 % del peso seco, para que corresponda a un contenido orgánico de sedimentos naturales de bajo a moderado (58).

Porcentaje de componentes secos del sedimento artificial:

| Componente | Características | % de sedimento seco |
|---|---|---|
| Turba | Turba esfágnea, grado de descomposición: «intermedio», secada al aire, sin restos vegetales visibles, muy triturada (granulometría ≤ 0,5 mm) | 2 ± 0,5 |
| Arena de cuarzo | Granulometría: ≤ 2 mm, pero más del 50 % de las partículas deben encontrarse en la banda de 50-200 µm | 76 |
| Caolín | Contenido en caolinita ≥ 30 % | 22 ± 1 |
| Fuente de alimento | *Folia urticae*, hojas en polvo de *Urtica sp.* (ortiga), muy trituradas (granulometría ≤ 0,5 mm), o una mezcla de hojas en polvo de *Urtica sp.* con alfa-celulosa (1: 1); de conformidad con las normas farmacéuticas, para consumo humano; añadida al sedimento seco | 0,4 - 0,5 % |
| Carbonato de calcio | $CaCO_3$, pulverizado, químicamente puro, añadido al sedimento seco | 0,05 - 1 |
| Agua desionizada | Conductividad ≤ 10 µS/cm, añadida al sedimento seco | 30 - 50 |

Si se espera una concentración elevada de amoníaco, por ejemplo si se sabe que la sustancia problema inhibe la nitrificación, puede ser útil sustituir el 50 % del polvo de ortiga rico en nitrógeno por celulosa (por ejemplo, polvo de α-celulosa, químicamente puro, granulometría de partículas ≤ 0,5 mm).

**Preparación**

La turba se seca al aire y se tritura hasta conseguir un polvo fino (granulometría ≤ 0,5 mm, sin restos de plantas visibles). Se prepara una suspensión de la cantidad necesaria de polvo de turba mediante una parte del agua desionizada que se vaya a añadir al sedimento seco [un volumen de agua de 11,5 × peso seco de la turba ha resultado útil para producir una lechada de turba que pueda agitarse (8)] con un dispositivo de homogeneización de altas prestaciones.

El pH de esta suspensión se ajusta a 5,5 ± 0,5 con $CaCO_3$. La suspensión se acondiciona durante al menos dos días, removiendo suavemente a 20 ± 2 °C, para estabilizar el pH y establecer un componente microbiano estable. Se vuelve a medir el pH y se ajusta a 6,0 ± 0,5 con $CaCO_3$ en caso necesario. A continuación, toda la suspensión se mezcla con el resto de componentes secos, teniendo en cuenta cualquier otra porción utilizada en el enriquecimiento. Se añade el agua desionizada restante para obtener un sedimento homogéneo. Se vuelve a medir el pH y se ajusta a 6,5 - 7,5 con $CaCO_3$, en caso necesario. Sin embargo, si se espera que se forme amoníaco, puede resultar útil mantener el pH del sedimento por debajo de 7,0 (por ejemplo, entre 6,0 y 6,5). Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el carbono orgánico total. Si se espera que se forme amoníaco, el sedimento artificial puede acondicionarse durante siete días en las mismas condiciones que vayan a prevalecer en el ensayo posterior (por ejemplo, proporción sedimento-agua 1:4, altura de la capa de sedimento como en los recipientes de ensayo), antes de enriquecerlo con la sustancia problema; es decir, debe rellenarse con agua, que debe haberse aireado. Al final del periodo de acondicionamiento, el agua sobrenadante debe eliminarse y descartarse. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido de carbono orgánico total (por ejemplo, tres muestras).

▼M6

Posteriormente, la arena de cuarzo enriquecida se mezcla con el sedimento en cada nivel de tratamiento; el sedimento se distribuye en los recipientes de ensayo replicados y se recubre con el agua de ensayo (por ejemplo, proporción sedimento-agua 1: 4, altura de la capa de sedimento como en los recipientes de ensayo). A continuación, los recipientes se incuban en las mismas condiciones que vayan a prevalecer en el ensayo posterior. Aquí es donde comienza el periodo de equilibrado. El agua sobrenadante debe airearse.

La fuente de alimento elegida debe añadirse antes o durante el enriquecimiento del sedimento con la sustancia problema. Inicialmente puede mezclarse con la suspensión de turba (véase más arriba). Sin embargo, se puede evitar la degradación excesiva de la fuente de alimento antes de añadir los organismos de ensayo (por ejemplo, en caso de que el periodo de equilibrado sea largo), manteniendo el periodo transcurrido entre la adición del alimento y el inicio de la exposición lo más breve posible. A fin de garantizar que el alimento esté en suficiente contacto con la sustancia problema, la fuente de alimento debe mezclarse con el sedimento, a más tardar el día en que el sedimento se enriquece con la sustancia problema. Se pueden hacer excepciones cuando la duración del periodo de equilibrado provoca una degradación microbiana excesiva del alimento antes de añadir los organismos de ensayo. Se toman muestras del sedimento para determinar el peso seco y el contenido de carbono orgánico total (por ejemplo, tres muestras de sedimento enriquecido o de control).

El peso seco de los componentes (turba, arena y caolín) debe indicarse en g y en porcentaje de peso seco total.

El volumen de agua que vaya a añadirse a los componentes secos durante la preparación del sedimento también debe indicarse en porcentaje del peso seco total (por ejemplo, 100 % del peso seco + 46 % de agua significa que 1 000 g de peso seco reciben, en total, 460 ml de agua, lo que se traduce en 1 460 g de sedimento húmedo).

**Almacenamiento**

Los componentes secos del sedimento artificial pueden almacenarse en un lugar fresco y seco, a temperatura ambiente. El sedimento húmedo preparado puede almacenarse (para usarlo posteriormente en el cultivo solamente) a 4 ± 2 °C en la oscuridad, durante un periodo de 2 a 4 semanas, a partir del día de preparación (8).

Una vez se haya añadido la sustancia problema al sedimento, este debe utilizarse inmediatamente, salvo que se disponga de información en el sentido de que ese sedimento concreto puede conservarse sin que se vean afectadas la toxicidad ni la biodisponibilidad de la sustancia problema. Es posible conservar muestras de sedimento enriquecido hasta el momento de su análisis en las condiciones recomendadas para la sustancia problema concreta.

▼M6

*Apéndice 6*

**Especies de oligoquetos recomendadas para los ensayos de bioacumulación**

***Tubifex tubifex* (MÜLLER), Tubificidae, Oligochaeta**

El oligoqueto tubifícido (Tubificidae, Oligochaeta) *Tubifex tubifex* (Müller) habita en sedimentos de agua dulce, en tubos recubiertos con moco. En estos tubos, los gusanos se encuentran cabeza abajo e ingieren partículas de sedimento utilizando los microorganismos y los restos orgánicos asociados. La parte posterior suele ondular en el agua sobrenadante para poder respirar. Aunque esta especie habita en una gran variedad de tipos de sedimento de todo el hemisferio norte, *Tubifex tubifex* prefiere granulometrías relativamente finas (59). La idoneidad de esta especie para los ensayos ecotoxicológicos se describe, por ejemplo, en (8) (29) (31) (39) (60) (62) (63).

*Métodos de cultivo*

Con el fin de disponer de un número suficiente de *Tubifex tubifex* para realizar ensayos de bioacumulación, los gusanos deben conservarse en un cultivo de laboratorio permanente. Para el cultivo de *T. tubifex* (8) se recomienda un sistema consistente en un sedimento artificial basado en el suelo artificial empleado en el método de ensayo C.8 (40), y agua reconstituida de acuerdo con el método de ensayo C.1.

Como recipientes de cultivo se pueden utilizar recipientes de vidrio o acero inoxidable, de una altura de 12 a 20 cm. Cada recipiente de cultivo se carga con una capa de sedimento artificial húmedo, preparado de acuerdo con la descripción del apéndice 5. La profundidad de la capa de sedimento debe permitir el comportamiento normal de excavación de los gusanos (profundidad mínima de 2 cm para la especie *T. tubifex*). Se añade agua reconstituida al sistema. Se debe tener cuidado para minimizar la alteración del sedimento. La masa de agua se airea suavemente (por ejemplo, dos burbujas por segundo, con aire filtrado por membrana de 0,45 μm) con una pipeta Pasteur colocada 2 cm por encima de la superficie del sedimento. La temperatura recomendada del cultivo es de 20 ± 2 °C.

Los gusanos se añaden al sistema de cultivo con una carga máxima de 20 000 individuos/$m^2$ de la superficie del sedimento. Una carga mayor puede provocar una reducción del crecimiento y de las tasas de reproducción (43).

En los cultivos de sedimento artificial hay que alimentar a los gusanos. Una dieta consistente en alimento para peces muy triturado como, por ejemplo, TetraMin®, puede servir como nutrición adicional (8); Klerks 1994, comunicación personal. Las tasas de alimentación deben permitir un crecimiento y una reproducción suficientes, y deben mantener al mínimo la acumulación de amoníaco y el crecimiento fúngico en el cultivo. El alimento puede administrarse dos veces a la semana (por ejemplo, 0,6 – 0,8 mg por $cm^2$ de la superficie del sedimento). La experiencia práctica ha demostrado que la aplicación de alimento en suspensión y homogeneizado en agua desionizada puede facilitar la distribución homogénea del alimento por la superficie del sedimento en los recipientes de cultivo.

Para evitar la acumulación de amoníaco, el agua sobrenadante debe cambiarse con un sistema dinámico o, al menos una vez a la semana, manualmente. El sedimento debe cambiarse cada tres meses en los cultivos madre.

El muestreo de gusanos del cultivo se puede llevar a cabo tamizando el sedimento del cultivo con un tamiz de 1 mm, si se necesitan solo adultos. Para retener los capullos, se puede utilizar una malla de 0,5 mm y para los gusanos juveniles, un tamiz de 0,25 mm. Los tamices se pueden colocar en agua reconstituida una vez que el sedimento los haya atravesado. Los gusanos salen de la malla y se pueden recoger del agua con unas pinzas de acero blandas o con una pipeta de bordes redondeados.

▼M6

Solo se utilizan ejemplares intactos y claramente identificados de *Tubifex tubifex* [por ejemplo, (64)] para iniciar un ensayo o nuevos cultivos. Deben descartarse los gusanos enfermos o lesionados, así como los capullos infestados de hifas fúngicas.

Un cultivo sincronizado puede suministrar gusanos de una edad concreta a los intervalos adecuados, si se desea. Los recipientes de los nuevos cultivos se preparan a los intervalos escogidos (por ejemplo, cada dos semanas), empezando con los animales de una edad concreta (por ejemplo, capullos). En las condiciones de cultivo descritas en este documento, los gusanos son adultos una vez transcurridas de 8 a 10 semanas. Los cultivos se pueden recoger cuando los gusanos han puesto nuevos capullos; por ejemplo, después de diez semanas. Los adultos recogidos se pueden utilizar en ensayos y con los capullos se pueden iniciar nuevos cultivos.

***Lumbriculus variegatus* (MÜLLER), Lumbriculidae, Oligochaeta**

La especie *Lumbriculus variegatus* (Lumbriculidae, Oligochaeta) también habita los sedimentos de agua dulce de todo el mundo y se utiliza ampliamente en los ensayos ecotoxicológicos. En las referencias (1) (6) (9) (36) se puede obtener información sobre la biología, las condiciones de cultivo y la sensibilidad de la especie. *Lumbriculus variegatus* también puede cultivarse en el sedimento artificial recomendado para *T. tubifex*, con ciertas limitaciones de acuerdo con (8). Como en la naturaleza *L. variegatus* prefiere sedimentos más gruesos que *T. tubifex* (59), los cultivos de laboratorio con el sedimento artificial utilizado con *T. tubifex* pueden extinguirse después de un periodo de 4 a 6 meses. La experiencia práctica ha demostrado que *L. variegatus* se puede mantener en un sustrato arenoso (por ejemplo, arena de cuarzo, gravilla fina) en un sistema dinámico con alimento para peces como fuente de nutrición a lo largo de varios años sin renovar el sustrato. Una de las grandes ventajas de *L. variegatus* frente a otras especies de oligoquetos acuáticos es su rápida reproducción, que provoca una biomasa que aumenta rápidamente en las poblaciones de cultivos de laboratorio (1) (6) (9) (10).

*Métodos de cultivo*

Las condiciones de cultivo de *Lumbriculus variegatus* se explican detalladamente en Phipps et al. (1993) (10), Brunson et al. (1998) (28), ASTM (2000) (1), U.S. EPA (2000) (6). A continuación se resumen brevemente estas condiciones.

Los gusanos pueden cultivarse en grandes acuarios (57 – 80 l) a 23 °C, con un fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8 (100 – 1 000 lux), con agua natural renovada diariamente (45 – 50 l por acuario). El sustrato se prepara cortando en tiras servilletas de papel marrón sin blanquear, que después pueden mezclarse con el agua del cultivo durante unos segundos para producir trocitos de sustrato de papel. Este sustrato puede utilizarse directamente en los acuarios de cultivo de *Lumbriculus*, recubriendo la superficie del fondo del recipiente, o se puede conservar congelado en agua desionizada para utilizarlo posteriormente. El nuevo sustrato en el recipiente durará generalmente unos dos meses.

Cada cultivo de gusanos comienza con 500 – 1 000 gusanos, que se alimentan con 10 ml de suspensión que contiene 6 g de alimento inicial para truchas, tres veces a la semana, en condiciones de renovación o dinámicas. Los cultivos estáticos o semiestáticos deben recibir menos alimento para evitar el crecimiento de bacterias y hongos. El alimento y el sustrato de papel deben analizarse para detectar la presencia de las sustancias que vayan a usarse en los ensayos de bioacumulación.

En estas condiciones, el número de individuos del cultivo se duplica, generalmente, en un periodo de entre 10 y 14 días.

*Lumbriculus variegatus* se puede extraer de los cultivos, por ejemplo transfiriendo a otro vaso el sustrato con una red de malla fina, o transfiriendo los organismos con una pipeta de boca amplia (de unos 5 mm de diámetro) de vidrio de extremos redondeados. Si se contransfiere sustrato a este vaso, el vaso que contiene gusanos y sustrato se deja por la noche en condiciones dinámicas, que eliminarán el sustrato de la misma, mientras que los gusanos se quedarán en el

▼M6

fondo del recipiente. A continuación se pueden introducir en recipientes de cultivo recién preparados o se pueden seguir preparando para el ensayo, tal y como se indica en (1) y (6). Deben evitarse las lesiones o la autotomía en los gusanos, por ejemplo utilizando pipetas con bordes redondeados o varillas de acero inoxidable para manipularlos.

Una cuestión que debe considerarse críticamente a la hora de usar *L. variegatus* en los ensayos de bioacumulación en sedimentos es su modo de reproducción (arquitomía seguida de morfalaxis). Esta reproducción asexual da como resultado dos fragmentos, que no se alimentan durante un determinado periodo, hasta que se regenera la parte de la cabeza o la cola [por ejemplo, (36) (37)]. Esto significa que en el caso de *L. variegatus*, es posible que la absorción de sedimento y contaminante por ingestión no se produzca continuamente como en los turbificidos, que no se reproducen por fragmentación.

Por lo tanto, debe realizarse una sincronización para minimizar la reproducción y la regeneración sin control, y la consiguiente gran variación en los resultados del ensayo. Esta variación puede ocurrir cuando algunos individuos, que se han fragmentado y, por lo tanto, no se alimentan durante un periodo determinado, quedan menos expuestos a las sustancia problema que otros individuos, que no se fragmentan durante el ensayo; por ejemplo, (38). En un periodo de entre 10 y 14 días antes del inicio de la exposición, los gusanos deben fragmentarse artificialmente (sincronización) (65). Deben utilizarse gusanos grandes que, preferiblemente, no muestren signos de fragmentación reciente. Estos gusanos se pueden colocar en un portaobjetos de vidrio, en una gota de agua de cultivo, y se pueden diseccionar en la zona mediana del cuerpo con un bisturí. Se debe comprobar que los extremos posteriores sean de un tamaño similar. A continuación, hay que dejar que los extremos posteriores regeneren nuevas cabezas en un recipiente de cultivo que contenga el mismo sustrato que el utilizado en el cultivo y agua reconstituida hasta el inicio de la exposición. La regeneración de cabezas nuevas se indica cuando los gusanos sincronizados se refugian en el sustrato (la presencia de cabezas regeneradas puede confirmarse inspeccionando una submuestra representativa con un microscopio binocular). Después, se espera que los organismos del ensayo presenten un estado fisiológico similar. Esto significa que, cuando se produce la regeneración por morfalaxis en gusanos sincronizados durante el ensayo, se espera que prácticamente todos los animales queden expuestos de igual manera al sedimento enriquecido. La alimentación de los gusanos sincronizados debe realizarse una vez, en cuanto los gusanos empiecen a refugiarse en el sustrato, o siete días después de la disección. El régimen de alimentación debe ser comparable al de los cultivos regulares, pero puede resultar recomendable alimentar los gusanos sincronizados con la misma fuente de alimento que vaya a utilizarse en el ensayo. Los gusanos deben mantenerse a la temperatura del ensayo, a 20 ± 2 °C. Después de la regeneración, deben utilizarse en el ensayo gusanos completos e intactos de tamaño similar, que naden o se arrastren activamente ante un pequeño estímulo mecánico. Deben evitarse las lesiones o la autotomía en los gusanos; por ejemplo, utilizando pipetas con bordes redondeados o varillas de acero inoxidable para manipularlos.

Cuando se utiliza la *Lumbriculus variegatus* en el ensayo y si las condiciones son las adecuadas (6), debe producirse un aumento del número de gusanos durante el ensayo debido al modo específico de reproducción de esta especie. La ausencia de reproducción en un ensayo de bioacumulación con *L. variegatus* debe quedar registrada y debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados del ensayo.

***Branchiura sowerbyi* (BEDDARD), Tubificidae, Oligochaeta (sin validación en el ensayo interlaboratorios)**

La especie *Branchiura sowerbyi* habita en diversos tipos de sedimentos, en pantanos, lagos, estanques y ríos, originalmente en zonas tropicales. También se puede encontrar en las masas de agua templada del hemisferio norte. Sin

▼M6

embargo, esta especie es más abundante en los sedimentos de barro y arcilla con un alto contenido en materia orgánica. Además, los gusanos viven en la capa de sedimento. Hasta el extremo posterior de los gusanos suele quedar dentro del sedimento. Esta especie se identifica fácilmente gracias a los filamentos branquiales de su parte posterior. Los adultos pueden llegar a medir entre 9 y 11 cm de largo, con un peso húmedo de 40-50 mg. Los gusanos presentan una alta tasa de reproducción, duplicando su población en menos de dos semanas y en las condiciones de temperatura y alimentación que se describen más adelante [Aston et al., 1982, (65)]. *B. sowerbyi* se ha utilizado en estudios de toxicidad y bioacumulación [Marchese y Brinkhurst 1996, (31) Roghair et al. 1996, (67) respectivamente].

*Métodos de cultivo*

A continuación se presenta un resumen de las condiciones de cultivo de la especie *Branchiura sowerbyi* (proporcionado por Mercedes R. Marchese, INALI, Argentina, y Carla J. Roghair, RIVM, Países Bajos).

No se requiere una sola técnica para cultivar los organismos. Los organismos pueden cultivarse con sedimento natural no contaminado (31). La experiencia práctica ha demostrado que un medio compuesto por sedimento natural y arena mejora el estado de los gusanos en comparación con un sedimento natural puro (32) (67). Para el cultivo se pueden utilizar vasos de 3 l que contengan 1 500 ml de medio de agua/sedimento, compuestas por 375 ml de sedimento natural no contaminado (aproximadamente un 10 % de carbono orgánico total; aproximadamente un 17 % de las partículas ≤ 63 μm), 375 ml de arena limpia (M32) y 750 ml de agua reconstituida o agua del grifo desclorada (31) (32) (67). También se pueden utilizar servilletas de papel como sustrato de cultivo, pero el crecimiento de la población será más lento que en el sedimento natural. En los sistemas semiestáticos, la capa de agua del vaso se airea lentamente y el agua sobrenadante debe cambiarse cada semana.

Cada vaso contiene 25 gusanos jóvenes al principio. Tras dos meses, se extraen los gusanos grandes del sedimento con unas pinzas y se colocan en un nuevo vaso con un medio recién preparado de sedimento/agua. El vaso viejo contiene también capullos y gusanos jóvenes. De esta forma se pueden recoger hasta 400 gusanos jóvenes por vaso. Los gusanos adultos se pueden utilizar en la reproducción al menos durante un año.

Los cultivos deben mantenerse a una temperatura de 21 a 25 °C. La variación de temperatura debe mantenerse por debajo de ± 2 °C. El tiempo necesario para el desarrollo del embrión a partir de un huevo puesto hasta que el gusano joven sale del capullo es aproximadamente de tres semanas a 25 °C. La producción de huevos obtenida por gusano superviviente en la especie *B. sowerbyi* ha resultado estar entre 6,36 (31) y 11,2 (30) en el barro a 25 °C. El número de huevos por capullo varía entre 1,8 y 2,8 (66) (69) o hasta 8 (68).

Cada semana hay que medir el oxígeno disuelto, la dureza del agua, la temperatura y el pH. Se puede añadir alimento para peces (por ejemplo, TetraMin®) en forma de suspensión, dos o tres veces por semana, *ad libitum*. Los gusanos también se pueden alimentar con lechuga descongelada *ad libitum*.

Una gran ventaja de esta especie es la gran biomasa individual (hasta 40-50 mg de peso húmedo por individuo). Por lo tanto, esta especie se puede utilizar en ensayos de bioacumulación de sustancias problema no marcadas radiactivamente. Puede exponerse en los sistemas utilizados con *T. tubifex* o *L. variegatus* con un solo individuo por réplica (11). Sin embargo, en ese caso, el número de réplicas debe aumentar, a menos que se utilicen cámaras de ensayo más grandes (11). Asimismo, el criterio de validez relacionado con el comportamiento de excavación debe ajustarse para esta especie.

▼**M6**

BIBLIOGRAFÍA

(1) ASTM International (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates, E 1688-00a. En ASTM International 2004 Annual Book of Standards. Volumen 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

(2) Comisión Europea (CE) (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market; Part I — IV. Oficina de Publicaciones Oficiales de la Unión Europea (Comisión Europea), Luxemburgo.

(3) OCDE (1992a). Report of the OECD workshop on effects assessment of chemicals in sediment. OECD Monographs Nº 60. Organización de Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), París.

(4) Ingersoll, C.G., Ankley, G.T., Benoit D.A., Brunson, E.L., Burton, G.A., Dwyer, F.J., Hoke, R.A., Landrum, P. F., Norberg-King, T. J. and Winger, P.V. (1995). Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates: A review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem. 14, pp. 1885-1894.

(5) Capítulo C.13 del presente anexo. Bioconcentración: Ensayo dinámico con peces.

(6) U.S. EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Segunda edición. EPA 600/R-99/064, Agencia de Protección del Medio Ambiente de EE. UU., Duluth, Minnesota, marzo de 2000.

(7) Capítulo C.27 del presente anexo. Ensayo de toxicidad para quironómidos en sistemas sedimento-agua con sedimento enriquecido.

(8) Egeler, Ph., Römbke, J., Meller, M., Knacker, Th., Franke, C., Studinger, G. & Nagel, R. (1997). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by tubificid sludgeworms (Oligochaeta) under standardised laboratory conditions. Chemosphere 35, pp. 835-852.

(9) Ingersoll, C.G., Brunson, E.L., Wang N., Dwyer, F.J., Ankley, G.T., Mount D.R., Huckins J., Petty. J. and Landrum, P. F. (2003). Uptake and depuration of nonionic organic contaminants from sediment by the oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 22, pp. 872-885.

(10) Phipps, G.L., Ankley, G.T., Benoit, D.A. and Mattson, V.R. (1993). Use of the aquatic Oligochaete Lumbriculus variegatus for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. Environ.Toxicol. Chem. 12, pp. 269-279.

(11) Egeler, Ph., Römbke, J., Knacker, Th., Franke, C. & Studinger, G. (1999). Workshop on «Bioaccumulation: Sediment test using benthic oligochaetes», 26.-27.04.1999, Hochheim/Main, Alemania. Report on the R+D-project Nº 298 67 419, Umweltbundesamt, Berlín.

(12) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. and Gilberg, D. (2006). Validation of a sediment bioaccumulation test with endobenthic aquatic oligochaetes by an international ring test. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau), R&D Nº: 202 67 437.

(13) Kelly, J.R., Levine, S.N., Buttel, L.A., Kelly, A.C., Rudnick, D.T. and Morton, R.D. (1990). Effects of tributyltin within a Thalassia seagrass ecosystem. Estuaries 13, pp. 301-310.

▼**M6**

(14) Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log Kow/log BCF correlations. En: R. Nagel y R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems. Contributions to the assessment. Proceedings of an international workshop, Berlín 1990. VCH, Weinheim

(15) Landrum, P.F., Lee II, H. and Lydy, M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, pp. 1709-1725.

(16) Markwell, R.D., Connell, D.W. and Gabric, A.J. (1989). Bioaccumulation of lipophilic compounds from sediments by oligochaetes. Wat. Res. 23, pp. 1443-1450.

(17) Gabric, A.J., Connell, D.W. and Bell, P.R.F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Wat. Res. 24, pp. 1225-1231.

(18) Kukkonen, J. and Landrum, P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated Pyrene to Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 13, pp. 1457-1468.

(19) Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D. and Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29, pp. 1501-1514.

(20) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment N$^{o}$ 23.

(21) U.S. EPA (1996). Special Considerations for Conducting Aquatic Laboratory Studies. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.1000. Borrador público. EPA 712-C-96-113. Agencia de Protección Ambiental de EE. UU.

(22) Los capítulos siguientes del presente anexo:

Capítulo A.4, Presión de vapor

Capítulo A.5, Tensión superficial

Capítulo A.6, Hidrosolubilidad

Capítulo A.8, Coeficiente de reparto, método del frasco agitado

Capítulo A.24, Coeficiente de reparto, método HPLC

Capítulo C.7, Degradación — degradación abiótica: hidrólisis en función del pH

Capítulo C.4 A-F, Determinación de la biodegradabilidad «fácil»

Capítulo C.19, Cálculo del coeficiente de adsorción ($K_{oc}$) en suelos y en lodos de aguas residuales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Capítulo C.29, Biodegradabilidad fácil — $CO_2$ en recipientes sellados

(23) OCDE (1996). Direct Phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals N$^{o}$ 3. OCDE, París.

(24) Antoine, M.D., Dewanathan, S. and Patonay, G. (1991). Determination of critical micelles concentration of surfactants using a near-infrared hydrophobicity probe. Microchem. J. 43, pp. 165-172.

▼**M6**

(25) Beek, B., S. Boehling, U. Bruckmann, C. Franke, U. Joehncke and G. Studinger (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation — New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlín Heidelberg: pp. 235-276.

(26) Spacie, A. and Hamelink, J.L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fisb. Environ. Toxicol. Chem. 1, pp. 309-320.

(27) Hawker, D.W. and Connell, D.W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Wat. Res. 22, pp. 701-707.

(28) Brunson, E.L., Canfield, T.J., Ingersoll, C.J. and Kemble, N.E. (1998). Assessing the bioaccumulation of contaminants from sediments of the Upper Mississippi river using field-collected oligochaetes and laboratory-exposed Lumbriculus variegatus. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, pp. 191-201.

(29) Reynoldson, T.B., Thompson, S.P. and Bamsey, J.L. (1991). A sediment bioassay using the tubificid oligochaete worm Tubifex tubifex. Environ. Toxicol. Chem. 10, pp. 1061-1072.

(30) Aston, R.J. and Milner, A.G.P. (1981). Conditions for the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) in activated sludge. Aquaculture 26, pp. 155-160.

(31) Marchese, M.R. and Brinkhurst, R.O. (1996). A comparison of two tubificid species as candidates for sublethal bioassay tests relevant to subtropical and tropical regions. Hydrobiologia 334, pp. 163-168.

(32) Roghair, C.J. and Buijze, A. (1994). Development of sediment toxicity tests. IV. A bioassay to determine the toxicity of field sediments to the oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719102027.

(33) Capítulo C. 1 del presente anexo: Ensayo de toxicidad aguda en peces.

(34) OCDE (1992c). Guidelines for Testing of Chemicals N$^{o}$ 210. Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OCDE, París.

(35) Kaster, J.L., Klump, J.V., Meyer, J., Krezoski, J. & Smith, M.E. (1984). Comparison of defecation rates of Limnodrilus hoffmeisteri using two different methods. Hydrobiologia 11, pp. 181-184.

(36) Leppänen, M.T. y Kukkonen, J.V.K. 1998: Factors affecting feeding rate, reproduction and growth of an oligochaete Lumbriculus variegatus (Müller). Hydrobiologia 377: pp. 183-194.

(37) Leppänen, M.T. & Kukkonen, J.V.K. 1998: Relationship between reproduction, sediment type and feeding activity of Lumbriculus variegatus (Müller): Implications for sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem. 17: pp. 2196-2202.

(38) Leppänen M.T. & Kukkonen J.V.K. (1998). Relative importance of ingested sediment and porewater as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Müller). Environ. Sci. Toxicol. 32, pp. 1503-1508.

(39) Martínez-Madrid, M., Rodríguez, P., Pérez-Iglesias, J.I. & Navarro, E. (1999). Sediment toxicity bioassays for assessment of contaminated sites in the Nervion river (Northern Spain). 2. Tubifex tubifex (Müller) reproduction sediment bioassay. Ecotoxicology 8, pp. 111-124.

▼**M6**

(40) Capítulo C.8 del presente anexo: Ensayo de toxicidad para gusanos de tierra.

(41) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

(42) Landrum, P.F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environ. Sci. Toxicol. 23, pp. 588-595.

(43) Poddubnaya, T.L. (1980). Life cycles of mass species of Tubificidae (Oligochaeta). En: R.O. Brinkhurst y D.G. Cook (eds.): Aquatic Oligochaeta Biology, pp. 175-184. Plenum Press, Nueva York.

(44) ASTM (1998). Standard guide for collection, storage, characterisation, and manipulation of sediment for toxicological testing. American Society for Testing and Materials, E 1391-94.

(45) Hooftman, R.N., van de Guchte, K. & Roghair, C.J. (1993). Development of ecotoxicological test systems to assess contaminated sediments. Joint report no. 1: Acute and (sub)chronic tests with the model compound chlorpyrifos. RIVM-719102022.

(46) Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment?. Chemosphere 32, pp. 1897-1905.

(47) Mount, D.R., Dawson, T.D. & Burkhard, L.P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem. 18, pp. 1244-1249.

(48) Randall, R.C., Lee II, H., Ozretich, R.J., Lake, J.L. & Pruell, R.J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Environ.Toxicol. Chem. 10, pp. 1431-1436.

(49) Gardner, W.S., Frez, W.A., Cichocki, E.A. & Parrish, C.C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography, 30, 1099-1105.

(50) Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37, pp. 911-917.

(51) De Boer, J., Smedes, F., Wells, D. & Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2. Exercise 1000. EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

(52) Kristensen, P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(53) Zok, S., Görge, G., Kalsch, W. & Nagel, R. (1991). Bioconcentration, metabolism and toxicity of substituted anilines in the zebrafish (Brachydanio rerio). Sci. Total Environment 109/110, pp. 411-421

(54) Nagel, R. (1988). Umweltchemikalien und Fische — Beiträge zu einer Bewertung. Habilitationsschrift, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Alemania.

(55) Janssen, M.P.M., A Bruins, T.H. De Vries & Van Straalen, N.M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: pp. 305-312.

(56) Van Brummelen, T.C. y Van Straalen, N.M. (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod Porcellio scaber. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: pp. 277-285.

▼**M6**

(57) Sterenborg, I., Vork, N.A., Verkade, S.K., Van Gestel, C.A.M. & Van Straalen, N.M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail Orchesella cincta. Environ. Toxicol. Chemistry 22: pp. 1167-1171.

(58) Suedel, B.C. & Rodgers, J.H. (1993). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13, pp. 1163-1175.

(59) Wachs, B. (1967). Die Oligochaeten-Fauna der Fließgewässer unter besonderer Berücksichtigung der Beziehung zwischen der Tubificiden-Besiedlung und dem Substrat. Arch. Hydr. 63, pp. 310-386.

(60) Oliver, B. G. (1987). Biouptake of chlorinated hydrocarbons from laboratory-spiked and field sediments by oligochaete worms. Environ. Sci. Technol. 21, pp. 785-790.

(61) Chapman, P.M., Farrell, M.A. & Brinkhurst, R.O. (1982a). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, pp. 47-67.

(62) Chapman, P.M., Farrell, M.A. y Brinkhurst, R.O. (1982b). Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to combinations of pollutants and environmental factors. Aquatic Toxicology 2, pp. 69-78.

(63) Rodríguez, P. & Reynoldson, T.B. (1999). Laboratory methods and criteria for sediment bioassessment. En: A. Mudroch, J.M. Azcue y P. Mudroch (eds.): Manual of Bioassessment of aquatic sediment quality. Lewis Publishers, Boca Raton, CRC Press LLC.

(64) Brinkhurst, R.O. (1971). A guide for the identification of British aquatic oligochaeta. Freshw. Biol. Assoc., Sci. Publ. N$^{o}$ 22.

(65) Egeler, Ph., Meller, M., Schallnaß, H.J. & Gilberg, D. (2005). Validation of a sediment toxicity test with the endobenthic aquatic oligochaete Lumbriculus variegatus by an international ring test. In co-operation with R. Nagel and B. Karaoglan. Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D N$^{o}$: 202 67 429.

(66) Aston, R.J., Sadler, K. & Milner, A.G.P. (1982). The effect of temperature on the culture of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta: Tubificidae) on activated sludge. Aquaculture 29, pp. 137-145.

(67) Roghair, C.J., Buijze, A., Huys, M.P.A., Wolters-Balk, M.A.H., Yedema, E.S.E. & Hermens, J.L.M. (1996). Toxicity and toxicokinetics for benthic organisms; II: QSAR for base-line toxicity to the midge Chironomus riparius and the tubificid oligochaete worm Branchiura sowerbyi. RIVM Report 719101026.

(68) Aston, R.J. (1984). The culture of Branchiura sowerbyi (Tubificidae, Oligochaeta) using cellulose substrate. Aquaculture 40, pp. 89-94.

(69) Bonacina, C., Pasteris, A., Bonomi, G. & Marzuoli, D. (1994). Quantitative observations on the population ecology of Branchiura sowerbyi (Oligochaeta, Tubificidae). Hydrobiologia, 278, pp. 267-274.

▼M7

## C.47. ENSAYO DE TOXICIDAD EN LAS PRIMERAS FASES DE VIDA DE LOS PECES

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 210 de la OCDE (2013). Los ensayos con peces en sus primeras fases de vida tienen por objeto determinar los efectos letales y subletales de los productos químicos en las fases y especies sometidas a ensayo. Proporcionan valiosa información para estimar los efectos crónicos letales y subletales que provoca el producto en otras especies de peces.

2. Las directrices de ensayo 210 se basan en una propuesta del Reino Unido que se trató en una reunión de expertos de la OCDE celebrada en Medmenham (Reino Unido) en noviembre de 1988. Dicha propuesta se actualizó en 2013 para reflejar la experiencia del uso del ensayo y las recomendaciones de un taller de la OCDE sobre ensayos de toxicidad en peces que tuvo lugar en septiembre de 2010 (1).

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

3. Se exponen los peces en sus primeras fases de vida a un intervalo de concentraciones del producto problema disuelto en agua. Es preferible usar un método dinámico, aunque si no es posible se puede emplear un método semiestático. Debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas difíciles (2) para obtener más información. El ensayo se inicia con la colocación de huevos fecundados en los recipientes de ensayo y continuará el periodo de tiempo, específico de cada especie, que sea necesario para que los peces testigo alcancen la etapa juvenil. Los efectos letales y subletales se evalúan y comparan con los valores de los testigos para determinar la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y, de ahí: i) la concentración sin efecto observado (NOEC) o ii) la $EC_x$ (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{20}$) mediante un modelo de regresión con el fin de estimar la concentración que produciría una variación del x % en el efecto analizado. La presentación de informes sobre las concentraciones y parámetros con efectos relevantes puede depender del marco normativo. Las concentraciones de ensayo deben englobar la ECx de forma que el valor de ECx se obtenga por interpolación y no por extrapolación (véanse las definiciones del apéndice 1).

### INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO PROBLEMA

4. El producto problema es el producto objeto del ensayo. Deben conocerse su hidrosolubilidad (véase el capítulo A.6 del presente anexo) y su presión de vapor (véase el capítulo A.4 del presente anexo). Para calcular la cantidad de producto en las soluciones problema debe disponerse de un método analítico fiable, cuyo límite de cuantificación y exactitud sean conocidos y notificados. Aunque no se requieran para la realización del ensayo, los resultados de un ensayo de toxicidad aguda (véanse los capítulos C.1 o C.49 del presente anexo), efectuado preferiblemente con la especie objeto del presente ensayo, pueden ofrecer información útil.

5. Si el método se utiliza para ensayar una mezcla, debe caracterizarse su composición en la medida de lo posible mediante, por ejemplo, la identidad química de sus componentes, la cantidad en que están presentes y las propiedades específicas de cada sustancia (como las mencionadas anteriormente). Antes de utilizar el método de ensayo con fines normativos en una mezcla hay que considerar si proporcionará resultados adecuados para la finalidad normativa en cuestión.

6. Entre la información útil para establecer las condiciones de ensayo se incluyen la fórmula estructural de la sustancia, su pureza, hidrosolubilidad, estabilidad en el agua y a la luz, $pK_a$, $P_{ow}$ y los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil (p. ej., capítulos C.4 o C.29 del presente anexo).

▼M7

VALIDEZ DEL ENSAYO

7. Para que el ensayo sea válido han de darse las condiciones siguientes:

— la concentración de oxígeno disuelto ha de ser > 60 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el ensayo;

— en ningún momento del ensayo la temperatura del agua debe variar en más de ± 1,5 °C entre los recipientes de ensayo ni entre dos días sucesivos y debe mantenerse en las gamas establecidas para la especie sometida a ensayo (apéndice 2);

— es obligatorio realizar mediciones analíticas de las concentraciones de ensayo;

— la tasa global de supervivencia de los huevos fecundados y la tasa de supervivencia tras la eclosión testigo y, en su caso, en los testigos de disolvente han de ser superiores o iguales a los límites establecidos en el apéndice 2.

8. Si se observa una desviación mínima en los criterios de validez, deben considerarse las consecuencias en cuanto a fiabilidad de los datos del ensayo y tales consideraciones deberán recogerse en el informe. Los efectos en la supervivencia, eclosión o crecimiento en el testigo de disolvente, en comparación con el testigo negativo, deberán notificarse y analizarse en el contexto de la fiabilidad de los datos del ensayo.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Recipientes de ensayo**

9. Se puede utilizar cualquier recipiente de vidrio, acero inoxidable o de otro material químicamente inerte. Como la silicona tiene una gran capacidad de absorción de sustancias lipófilas, se debe minimizar el uso de tubos de silicona en ensayos dinámicos y de juntas de silicona en contacto con el agua usando, por ejemplo, acuarios con cristal monobloque. Las dimensiones de los recipientes deben ser lo suficientemente amplias como para permitir un crecimiento adecuado en el testigo, manteniendo la concentración de oxígeno disuelto (p. ej., para especies de peces pequeños, un tanque adecuado es el de un volumen de 7 litros) y de acuerdo con los criterios de tasa de carga descritos en el punto 19. Es conveniente colocar los recipientes al azar en la zona donde se lleve a cabo el ensayo. Es preferible colocar los recipientes según un esquema de bloques aleatorizados (velando por que todos los tratamientos se apliquen en todos los bloques) que según un esquema completamente aleatorizado. Los recipientes de ensayo han de protegerse de toda perturbación indeseada. El sistema de ensayo deberá acondicionarse preferentemente con concentraciones del producto problema durante un periodo suficiente como para demostrar concentraciones de exposición estables antes de introducir los organismos de ensayo.

**Selección de las especies**

10. Las especies de peces recomendadas figuran en el cuadro 1. Pueden utilizarse otras especies, pero entonces puede que haya que adaptar el procedimiento de ensayo para obtener condiciones experimentales convenientes. En tal caso, deben justificarse la elección de la especie y el método experimental.

**Preparación de los peces reproductores**

11. El apéndice 3 y las referencias (3), (4) y (5) citadas recogen indicaciones detalladas sobre la preparación de peces reproductores en condiciones satisfactorias.

**Manipulación de los huevos fecundados, los embriones y las larvas**

12. Los huevos fecundados, los embriones y las larvas pueden colocarse inicialmente en receptáculos de vidrio o acero inoxidable provistos de paredes o extremos de malla dentro del recipiente principal para permitir el flujo de la

▼M7

solución de ensayo por el recipiente. Puede provocarse un flujo no turbulento a través de los receptáculos suspendiéndolos de un brazo que los desplace en sentido vertical, pero de manera que los organismos permanezcan siempre sumergidos. Los huevos fecundados de salmónidos pueden depositarse en rejillas o mallas con aperturas de dimensiones suficientes para que las larvas pasen a través después de la eclosión.

13. Si se utilizan cubetas, rejillas o mallas para mantener los huevos en el recipiente principal de ensayo, deben retirarse después de la eclosión de las larvas (siguiendo las instrucciones del apéndice 3), pero deben conservarse las mallas que impidan que las larvas se escapen. Si es necesario trasladar las larvas, no deben exponerse al aire ni emplearse redes para sacar las larvas de los recipientes que contengan los huevos. El momento de dicho traslado varía según la especie y debe recogerse en el informe, aunque no siempre es necesario realizar el traslado.

**Agua**

14. Puede utilizarse para el ensayo toda agua en la que la especie de ensayo muestre unas tasas de crecimiento y supervivencia a largo plazo adecuadas (véase el apéndice 4). Su calidad ha de ser constante a lo largo de todo el ensayo. Deben tomarse muestras periódicamente para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación del producto problema) ni altera el comportamiento de los peces reproductores. Se debe proceder a la determinación de los metales pesados (p. ej., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de los aniones y cationes principales (p. ej., $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, $Cl^{-}$, $SO4^{2-}$), del amoníaco, de los niveles residuales totales de plaguicidas clorados, del carbono orgánico total y de los sólidos en suspensión, por ejemplo dos veces al año cuando se sepa que un agua de dilución es de calidad relativamente constante. Si hay constancia de la variabilidad de la calidad del agua, las mediciones deberán realizarse con mayor frecuencia. Dicha frecuencia dependerá de la variabilidad de la calidad. En el apéndice 4 se recogen algunas características químicas que debe tener el agua de dilución para ser aceptada.

**Soluciones de ensayo**

15. Para los ensayos dinámicos se requiere un sistema que aporte y diluya continuamente la solución madre del producto problema (por ejemplo, bomba dosificadora, diluidor proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los caudales de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad y no deberían variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Se considera adecuado un caudal equivalente al menos a cinco veces el volumen del recipiente de ensayo cada 24 horas (3). Sin embargo, si se respeta la tasa de carga indicada en el punto 19, se puede usar un caudal menor, p. ej. de 2-3 veces el volumen del recipiente de ensayo, para evitar una retirada rápida del alimento.

16. Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación del producto problema en el agua de dilución (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad) o métodos de dosificación pasiva (6) para lograr la concentración adecuada de la solución madre. No se recomienda usar un disolvente vehículo. Sin embargo, en el caso de que sea necesario usar un disolvente, debe realizarse un testigo del disolvente en paralelo y con la misma concentración de disolvente que en los tratamientos con el producto problema; es decir, es preferible que el nivel de disolvente sea igual en todos los grupos tratados y en el grupo testigo de disolvente. Esto puede ser técnicamente difícil de lograr en algunos sistemas diluidores; en este caso la concentración de disolvente en el testigo de disolvente debe ser igual a la concentración de disolvente más alta en el grupo de tratamiento. En caso de sustancias difíciles de estudiar, se debe

▼M7

consultar el documento de orientación número 23 de la OCDE sobre los ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas difíciles (2). En caso de utilizar un disolvente, su elección vendrá determinada por las propiedades químicas de la sustancia. El documento de orientación número 23 de la OCDE recomienda una concentración máxima de 100 µl/l. Se recomienda mantener la concentración de disolvente lo más baja posible con el fin de evitar que el disolvente pueda influir en los parámetros medidos (7).

17. En el caso de los ensayos semiestáticos, pueden aplicarse dos métodos distintos de renovación. O bien se preparan soluciones problema nuevas en recipientes limpios y se transfieren cuidadosamente los huevos y larvas supervivientes a los nuevos recipientes, o bien se dejan los organismos de ensayo en su recipiente y se cambian al menos los dos tercios del volumen de la solución de ensayo/testigo.

PROCEDIMIENTO

**Condiciones de exposición**

*Duración*

18. Conviene iniciar el ensayo lo antes posible tras la fecundación de los huevos. Los embriones se sumergen en la solución de ensayo preferiblemente antes de que comience la fase de división del blastodisco, o lo antes posible después de esta fase. La duración del ensayo dependerá de la especie utilizada. En el apéndice 2 se recogen recomendaciones al respecto.

*Carga*

19. El número de huevos fecundados al principio del ensayo ha de ser suficiente para responder a las necesidades estadísticas. Se reparten al azar entre los distintos tratamientos y se coloca un mínimo de 80 huevos fecundados, repartidos equitativamente entre, al menos, cuatro recipientes de ensayo en paralelo por cada concentración. La tasa de carga (biomasa por volumen de solución de ensayo) debe ser suficientemente baja para poder mantener sin aireación una concentración mínima de oxígeno disuelto del 60 % del valor de saturación en el aire durante las fases de huevo y larva. En los ensayos dinámicos, se recomienda una tasa de carga que no supere 0,5 g/l de peso húmedo en 24 horas ni 5 g/l de solución en cualquier momento (3).

*Luz y temperatura*

20. El fotoperiodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (apéndice 2).

*Alimentación*

21. La alimentación es fundamental y es esencial proporcionar los alimentos adecuados a cada fase de vida en el momento apropiado y en cantidades suficientes para asegurar un crecimiento normal. La alimentación debe ser aproximadamente igual en todas las réplicas, a menos que se ajuste para tener en cuenta la mortalidad. La comida no consumida y los excrementos deben evacuarse siempre que sea necesario para evitar la acumulación de desechos. En el apéndice 3 se recogen pautas de alimentación detalladas, pero, a medida que se va adquiriendo más experiencia, estas se van corrigiendo de forma continua para mejorar la supervivencia y optimizar el crecimiento. Los alimentos vivos enriquecen el entorno, por lo que, siempre que sea adecuado para las especies y la fase de vida, debe preferirse su uso al de alimentos secos o congelados o utilizarse además de estos.

*Concentraciones de ensayo*

22. Normalmente se requieren cinco concentraciones de producto problema, con un mínimo de cuatro réplicas por cada concentración, espaciadas por un factor constante que no supere 3,2. Se deberá tener en cuenta la información disponible sobre ensayos de toxicidad aguda, preferiblemente con las mismas especies, o considerar la realización de una prueba de determinación del intervalo (1) a la hora de seleccionar el intervalo de concentraciones de

▼M7

ensayo. No obstante, deben tenerse en cuenta todas las fuentes de información a la hora de seleccionar el intervalo de concentraciones de ensayo, incluidas fuentes como, p. ej., datos extrapolados de ensayos de toxicidad aguda en embriones de peces. Cuando solo se vayan a establecer concentraciones sin efecto observado (NOEC) empíricas, se podrá emplear como el ensayo definitivo un ensayo límite, o un ensayo límite ampliado, con menos de cinco concentraciones. Si se usan menos de cinco concentraciones, hay que justificarlo. No es preciso someter a ensayo concentraciones del producto problema superiores a la $CL_{50}$ tras 96 horas, o a 10 mg/l si esta concentración es inferior.

*Testigos*

23. Solo se debe utilizar un testigo de agua de dilución y, si es necesario, un testigo de disolvente que contenga el disolvente vehículo, además de la serie de concentraciones del producto problema (véase el punto 16).

**Frecuencia de las determinaciones analíticas y las mediciones**

24. Antes de que comience el periodo de exposición, debe garantizarse el funcionamiento correcto del sistema de distribución del producto en todas las réplicas (por ejemplo, mediante la medición de las concentraciones de ensayo). Deben estar especificados todos los métodos analíticos, incluidos los límites adecuados de cuantificación (LOQ) y los conocimientos suficientes sobre la estabilidad del producto en el sistema de ensayo. Durante el ensayo, las concentraciones del producto problema se determinan periódicamente para caracterizar la exposición. Se requieren como mínimo cinco determinaciones. En sistemas dinámicos, se deberán realizar mediciones analíticas del producto problema en una réplica por concentración al menos una vez a la semana, cambiando sistemáticamente entre réplicas. Las determinaciones analíticas adicionales mejoran a menudo la calidad de los resultados del ensayo. En algunos casos puede estar indicado filtrar las muestras para eliminar partículas (por ejemplo, con un filtro de 0,45 μm de diámetro de poro) o centrifugarlas para garantizar que las determinaciones se realizan con el producto en solución verdadera. Los filtros deber saturarse antes de su uso con el fin de reducir la adsorción del producto problema. Cuando las concentraciones medidas no permanezcan en un intervalo del 80-120 % de la concentración nominal, se deberán determinar las concentraciones con efecto. Dichas concentraciones deben expresarse en relación con la media aritmética de la concentración en ensayos dinámicos [véase el apéndice 6 del método de ensayo C.20 para consultar el cálculo de la media aritmética (8)], y en relación con la media geométrica de las concentraciones medidas en ensayos semiestáticos [véase el capítulo 5 del documento de orientación de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática de sustancias y mezclas difíciles (2)].

25. Durante el ensayo deben medirse en todos los recipientes de ensayo el oxígeno disuelto, la temperatura y el pH al menos una vez por semana. Si procede, deben medirse además la salinidad y la dureza al comenzar y al finalizar el ensayo. La temperatura debe someterse preferentemente a supervisión continua al menos en un recipiente de ensayo.

**Observaciones**

26. **Fase de desarrollo embrionario**: al principio de la exposición al producto problema debe comprobarse con tanta precisión como sea posible la fase embrionaria en una muestra representativa de huevos debidamente conservados y limpios.

27. **Eclosión y supervivencia**: al menos una vez al día deben observarse y contarse las eclosiones y los supervivientes, y anotar estos datos. Si se observan hongos en los huevos al principio de la fase de desarrollo embrionario (p. ej., en el primer o segundo día del ensayo), los huevos afectados deberán contarse y retirarse. Los embriones, las larvas y los peces juveniles muertos deben retirarse en cuanto se localicen, ya que pueden descomponerse rápidamente y pueden deshacerse con las acciones de los demás peces. Dicha retirada ha de hacerse con sumo cuidado para no dañar físicamente los huevos y larvas adyacentes. Los signos para considerar que un organismo está muerto varían según la especie y la fase del desarrollo. Por ejemplo:

▼M7

— para huevos fertilizados: sobre todo en la fase más temprana, disminución acusada de translucidez y cambio de la coloración, debido a la coagulación o la precipitación de las proteínas, que les dan un aspecto blanco opaco;

— en embriones, larvas y peces juveniles: inmovilidad, ausencia de movimiento respiratorio, ausencia de latido cardíaco o ausencia de reacción a los estímulos mecánicos.

28. **Aspecto anómalo**: el número de larvas o peces juveniles que presenten anomalías corporales debe registrarse a intervalos adecuados con arreglo a la duración del ensayo y la naturaleza de la anomalía observada. Cabe señalar que la aparición de larvas y peces juveniles anómalos ocurre en condiciones normales y que su proporción puede alcanzar varias unidades por cada cien en los testigos de algunas especies. Si las deformaciones y los comportamientos anómalos asociados se consideran tan graves como para que haya un notable sufrimiento del organismo y se ha alcanzado un punto en el que la recuperación no será posible, se podrá retirar el organismo del ensayo. Se deberá practicar la eutanasia a dichos animales y se considerarán como muertes en el posterior análisis de datos. Se ha documentado un desarrollo embrionario normal para la mayoría de las especies recomendadas en este método de ensayo (9) (10) (11) (12).

29. **Comportamiento anómalo**: las anomalías como la hiperventilación, natación descoordinada, inactividad atípica o comportamiento alimentario atípico deben registrarse a intervalos adecuados según la duración del ensayo (p. ej., una vez al día para las especies de aguas cálidas). Pese a ser difíciles de cuantificar, estos efectos, si se observan, pueden contribuir a interpretar los datos de mortalidad.

30. **Peso**: al final del ensayo deben pesarse todos los peces supervivientes, al menos por réplicas (registrando el número de animales en cada réplica y el peso medio por animal); se prefiere el peso húmedo (secados con material absorbente), aunque también se podrá registrar el peso seco (13).

31. **Longitud**: al final del ensayo debe medirse la longitud de cada sujeto. Se recomienda medir la longitud total de los peces; no obstante, si se observa una descomposición de la aleta caudal o un desgaste de las aletas, debe emplearse la longitud estándar. Debe usarse el mismo método para medir todos los peces de un ensayo determinado. La longitud de cada sujeto puede medirse, p. ej., mediante pinzas, una cámara digital o un micrómetro ocular calibrado. En el apéndice 2 se recogen las longitudes mínimas típicas.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

32. Se recomienda que el diseño del experimento y la prueba estadística seleccionada permitan una potencia adecuada (del 80 % o superior) para detectar cambios de importancia biológica en los parámetros cuando hay que informar de una NOEC. La presentación de informes sobre las concentraciones y parámetros con efectos relevantes puede depender del marco normativo. Si hay que informar de una $EC_x$, el diseño del ensayo y el modelo de regresión elegido deben permitir la estimación de la $EC_x$ de forma que: i) el intervalo de confianza del 95 % registrado para la $EC_x$ no incluya el valor nulo (cero) y no sea demasiado amplio, ii) el intervalo de confianza del 95 % para la media esperada a $EC_x$ no contenga la media del testigo y iii) no haya un desajuste significativo del modelo de regresión respecto a los datos. En ambos enfoques hay que identificar la variación porcentual de cada parámetro que sea importante detectar o estimar. Para que esto sea posible, debe elegirse en consecuencia el diseño del ensayo. Cuando no se cumplan las condiciones indicadas anteriormente para determinar la $EC_x$, deberá utilizarse el enfoque de la NOEC. No es probable que se aplique la misma variación porcentual a todos los parámetros, y tampoco lo es que se pueda diseñar un experimento factible que cumpla dichas condiciones para todos los parámetros. Por ello es importante centrarse en los parámetros relevantes para el

▼M7

experimento en cuestión a la hora de diseñarlo adecuadamente. Las directrices y los diagramas de flujo estadísticos para cada enfoque, que se recogen en los apéndices 5 y 6, pueden orientar sobre el tratamiento de los datos y la elección de la prueba o modelo estadístico más apropiado. Se podrán usar otros enfoques estadísticos, siempre que estén científicamente justificados.

33. Será preciso analizar las variaciones en cada serie de réplicas en paralelo mediante el análisis de la varianza o las tablas de contingencia y se usarán métodos de análisis estadísticos adecuados en función de los resultados obtenidos. Para realizar comparaciones múltiples entre los resultados obtenidos a cada concentración y los de los testigos, se recomienda usar la prueba de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra o la prueba de Williams para respuestas continuas y la prueba de ajuste secuencial de Cochran-Armitage para respuestas cuantales que sean coherentes con una relación concentración-respuesta monónota y no presenten indicios de variación extra-binomial (14). Cuando haya evidencia de variación extra-binomial, se recomienda usar la modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage (15) (16), emplear la prueba de Williams o la prueba de Dunnett (después de una transformación arcoseno de la raíz cuadrada) o usar la prueba de Jonckheere-Terpstra ajustada a las proporciones de las réplicas. Cuando los datos no sean coherentes con una relación concentración-respuesta monótona, puede resultar útil emplear los métodos de Dunnett, Dunn o Mann-Whitney para respuestas continuas y la prueba exacta de Fisher para respuestas cuantales (14) (17) (18). Durante la aplicación de cualquier método o modelo estadístico, deben cumplirse los requisitos de dicho método o modelo (p. ej., estimar la variabilidad entre recipientes y tenerla en cuenta en el diseño experimental y en el ensayo o modelo empleado). Debe evaluarse la normalidad de los datos. En el apéndice 5 se indica el procedimiento que debe seguirse con los valores residuales del ANOVA. En el apéndice 6 se recogen consideraciones adicionales sobre el enfoque de regresión. Se deben tener en cuenta las transformaciones necesarias para cumplir los requisitos de una prueba estadística. Las transformaciones necesarias para el ajuste de un modelo de regresión, no obstante, exigen una especial atención, ya que, por ejemplo, una variación del 25 % en una respuesta no transformada no corresponde a una variación del 25 % en una respuesta transformada. En todos los análisis la unidad de análisis debe ser el recipiente de ensayo, y no cada uno de los peces. La unidad experimental, los contrastes de hipótesis y la regresión deben reflejar este hecho (3) (14) (19) (20).

**Informe del ensayo**

34. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema:*

Sustancia de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nomenclatura IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica (incluido el contenido de carbono orgánico, si procede).

Sustancia de componentes múltiples, sustancias UVCB y mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible, p. ej., la identidad química (véase el párrafo anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Especie de ensayo:*

— denominación científica, variedad, fuente y método de recogida de los huevos fecundados y manipulaciones posteriores.

▼M7

*Condiciones del ensayo:*

— procedimiento de ensayo aplicado (p. ej., semiestático o dinámico, carga);

— fotoperiodo(s);

— diseño del ensayo [p. ej., número de recipientes de ensayo y número de réplicas, número de huevos por réplica, material y dimensiones del recipiente de ensayo (altura, anchura, volumen), volumen de agua de cada recipiente de ensayo];

— método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificará el agente de disolución empleado y su concentración);

— método de dosificación del producto problema (p. ej., bombas, sistemas de dilución);

— eficiencia de recuperación del método y concentraciones nominales de ensayo, límite de detección, medias de los valores medidos en los recipientes de ensayo y sus desviaciones típicas, método de obtención y datos que muestren que las mediciones se refieren a las concentraciones del producto problema en disolución verdadera;

— características del agua de dilución: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión (si se ha medido), salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada;

— calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto;

— información detallada de la alimentación (por ejemplo, tipo de alimento o alimentos, procedencia, cantidad proporcionada y frecuencia).

*Resultados registrados individualmente (o por réplica) y como media y coeficiente de variación, si procede, de los siguientes parámetros:*

— datos que demuestren que los testigos cumplen la norma general de aceptabilidad en materia de supervivencia de la especie sometida a ensayo (apéndice 2);

— datos sobre la mortalidad en cada fase (embrionaria, larval y juvenil) y mortalidad acumulativa;

— días transcurridos hasta la eclosión, número de eclosiones por día y día en que acaba la eclosión;

— número de peces sanos al final del ensayo;

— longitud (especifíquense si es estándar o total) y peso de los animales supervivientes;

— incidencia, descripción y número de anomalías morfológicas, si las hay;

— incidencia, descripción y número de efectos sobre el comportamiento, si los hay;

— enfoque de análisis estadístico utilizado (análisis de regresión o análisis de la varianza) y de tratamiento de los resultados (prueba o modelo estadístico utilizado);

— concentración sin efecto observado para cada respuesta evaluada (NOEC);

▼M7

— concentración mínima con efecto observado (para p = 0,05) para cada respuesta evaluada (LOEC);

— si procede, $EC_x$ para cada respuesta evaluada e intervalos de confianza (p. ej., del 90 % o el 95 %), así como una representación gráfica del modelo ajustado usado para su cálculo, la pendiente de la curva de concentración-respuesta, la fórmula del modelo de regresión, los parámetros estimados del modelo y sus errores estándares.

*Cualquier desviación respecto al método de ensayo.*

*Discusión de los resultados del ensayo, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.*

*Cuadro 1*

**Especies de peces recomendadas para el ensayo**

| DE AGUA DULCE | DE ESTUARIO y MARINAS |
|---|---|
| *Oncorhynchus mykiss*<br>Trucha arcoiris | *Cyprinodon variegatus*<br>Petota |
| *Pimephales promelas*<br>Pez cabeza gorda | Menidia sp.<br>Pejerrey |
| *Danio rerio*<br>Pez cebra | |
| *Oryzias latipes*<br>Medaka | |

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2012), Fish Toxicity Testing Framework, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.171, OECD, Paris.

(2) OCDE (2000), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. No. 23, OECD Paris.

(3) ASTM (1988), Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials, E 1241-88. 26 pp.

(4) Brauhn, J.L. and R.A. Schoettger (1975), Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel catfish and Bluegills, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(5) Brungs, W.A. and B.R. Jones (1977), Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(6) Adolfsson-Erici, *et al*. Adolfsson-Erici, et al. (2012), A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests, Chemosphere 86, 593-599.

(7) Hutchinson, T.H. *et al*. (2006), Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review, Aquatic Toxicology, 76, 69-92.

(8) Capítulo C.20 del presente anexo, Ensayo de reproducción en *Daphnia magna*.

(9) Hansen, D.J. and P.R. Parrish (1977), Suitability of sheepshead minnows (Cyprindon variegatus) for life-cycle toxicity tests, In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink), ASTM STP 634.

(10) Kimmel, H. B.*et al*. (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203:253–310.

▼**M7**

(11) Gonzalez-Doncel, M. *et al* (2005), A quick reference guide to the normal development of *Oryzias latipes* (Teleostei, Adrinichthydae) Journal of Applied Ichthyology, 20:1–14.

(12) Devlin, E.W. *et al*. (1996), Prehatching Development of the Fathead Minnow, Pimephales promelas Rafinesque. EPA/600/R-96/079. USEPA, Office of Research and Development, Washington, D.C..

(13) Oris, J.T., S.C. Belanger, and A.J. Bailer, (2012), Baseline characteristics and statistical implications for the OECD 210 Fish Early Life Stage Chronic Toxicity Test, Environmental Toxicology and Chemistry 31; 2, 370 — 376.

(14) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(15) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1992), A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

(16) Rao, J.N.K. and A.J. Scott (1999), A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

(17) Dunnett C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of Ameican Statistical Association, 50, 1096-1121.

(18) Dunnett C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482-491.

(19) Rand, G.M. and S.R. Petrocelli (1985), Fundamentals of Aquatic Toxicology. Hemisphere Publication Corporation, New York.

(20) McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data, Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

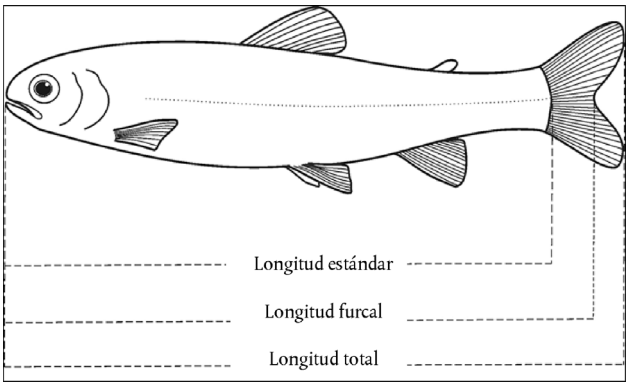
***Longitud furcal (FL)****:* longitud desde la punta del hocico hasta la escotadura de la aleta caudal. Se utiliza en peces en los que es difícil apreciar dónde termina la columna vertebral (www.fishbase.org).

***Longitud estándar (SL)****:* longitud de un pez medida desde la punta del hocico hasta el extremo posterior de la última vértebra o hasta el extremo posterior de la parte mediolateral de la placa hipural. Básicamente, en esta medida se excluye la aleta caudal (www.fishbase.org).

***Longitud total (TL)****:* longitud desde la punta del hocico hasta la punta del lóbulo más largo de la aleta caudal, normalmente se mide con los lóbulos comprimidos a lo largo de la línea media. Se mide en línea recta, y no siguiendo la curvatura del cuerpo (www.fishbase.org).

*Figura 1*

**Descripción de las diferentes longitudes utilizadas**




**Producto**: sustancia o mezcla.

**$EC_x$**: (concentración con efecto del x %); concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado periodo de exposición cuando se compara con un testigo. Por ejemplo, una $EC_{50}$ es una concentración de la que se estima que causa un efecto sobre un parámetro de ensayo en el 50 % de una población a lo largo de un determinado periodo de exposición.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: concentración más baja de producto problema con la que se observa un efecto estadístico significativo (con $p < 0,05$) en comparación con el testigo. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC). En los apéndices 5 y 6 se recogen las directrices pertinentes.

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el testigo, no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro del periodo de exposición establecido.

**Producto problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**UVCB**: sustancia de composición desconocida o variable, productos de reacción compleja y materiales biológicos.

**IUPAC**: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

**SMILES**: Sistema Simplificado de Registro de Líneas Moleculares.

▼M7

*Apéndice 2*

**CONDICIONES Y DURACIÓN DEL ENSAYO Y CRITERIOS DE SUPERVIVENCIA PARA LAS ESPECIES RECOMENDADAS**

| ESPECIES | CONDICIONES DEL ENSAYO | | | DURACIÓN RECOMENDABLE DEL ENSAYO | Longitud total media mínima típica de los peces testigo al final del ensayo (mm) ([1]) | SUPERVIVENCIA EN LOS TESTIGOS (mínima) | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Temperatura (°C) | Salinidad ($^0/_{00}$) | Fotoperiodo (horas) | | | Tasa de eclosiones satisfactorias | Tasa de supervivencia tras la eclosión |
| **Agua dulce:** | | | | | | | |
| ***Oncorhynchus mykiss*** Trucha arcoiris | 10 ± 1,5 ([2]) | | 12 — 16 ([3]) | Dos semanas después de que los testigos tomen el alimento del agua (o 60 días tras la eclosión) | 40 | 75 % | 75 % |
| ***Pimephales promelas*** Pez cabeza gorda | 25 ± 1,5 | | 16 | 32 días desde el inicio del ensayo (o 28 días tras la eclosión) | 18 | 70 % | 75 % |
| ***Danio rerio*** Pez cebra | 26 ± 1,5 | | 12 — 16 ([4]) | 30 días tras la eclosión | 11 | 70 % | 75 % |
| ***Oryzias latipes*** Medaka | 25 ± 2 | | 12 — 16 ([4]) | 30 días tras la eclosión | 17 | 80 % | 80 % |
| **De estuario y marina:** | | | | | | | |
| ***Cyprinodon variegatus*** Petota | 25 ± 1,5 | 15-35 ([5]) | 12 — 16 ([4]) | 32 días desde el inicio del ensayo (o 28 días tras la eclosión) | 17 | 75 % | 80 % |
| **Menidia sp.** Pejerrey | 22 — 25 | 15-35 ([5]) | 13 | 28 días | 20 | 80 % | 60 % |

*Leyenda:*

([1]) A pesar de que la longitud total media mínima típica no constituya un criterio de validez, deberán examinarse cuidadosamente las desviaciones inferiores al valor indicado en relación con la sensibilidad del ensayo. La longitud total media mínima se obtiene de una selección de datos actualizados en el momento actual.

([2]) Es posible que deban utilizarse otras temperaturas para la variedad concreta de trucha arcoíris utilizada en el ensayo. Los peces reproductores deben permanecer a la misma temperatura que los huevos. Después de recibir los huevos de un criadero comercial, hay que realizar una breve adaptación (p. ej., 1-2 horas) a la temperatura del ensayo.

([3]) Las larvas deben permanecer en la oscuridad hasta una semana después de la eclosión, salvo durante las observaciones. Después, deben estar a luz tenue hasta el final del ensayo (12-16 horas de fotoperiodo) ([4]).

([4]) En cualquiera de las condiciones del ensayo, el régimen de iluminación deberá ser constante.

([5]) En cualquier ensayo, se realizará a ± 2 $^0/_{00}$.

▼M7

*Apéndice 3*

**DIRECTRICES DE ALIMENTACIÓN Y MANIPULACIÓN DE PECES REPRODUCTORES Y ANIMALES DE ENSAYO PARA LAS ESPECIES RECOMENDADAS**

| ESPECIES | ALIMENTO (*) | | | | MOMENTO DE TRASLADO TRAS LA ECLOSIÓN | MOMENTO DE LA PRIMERA ALIMENTACIÓN |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Peces reproductores | Larvas recién eclosionadas | Juveniles | | | |
| | | | Tipo | Frecuencia | | |
| **Agua dulce:** | | | | | | |
| ***Oncorhynchus mykiss*** Trucha arcoiris | Alimento para truchas | Ninguno ([a]) | Alimento inicial para truchas, BSN | 2-4 veces al día | 14-16 días tras la eclosión o en la etapa de nadar hacia arriba (no es esencial) | 19 días tras la eclosión o en la etapa de nadar hacia arriba |
| ***Pimephales promelas*** Pez cabeza gorda | BSN, alimento en escamas, FBS | BSN | BSN48, alimento en escamas | 2-3 veces al día | Cuando la eclosión está al 90 % | 2 días tras la eclosión |
| ***Danio rerio*** Pez cebra | BSN, alimento en escamas | Alimento comercial para larvas, protozoos ([b]), proteína ([c]) | BSN48, alimento en escamas, | BSN, una vez al día; alimento en escamas, dos veces al día | Cuando la eclosión está al 90 % | 2 días tras la eclosión |
| ***Oryzias latipes*** Medaka | Alimento en escamas | BSN, alimento en escamas (o protozoos o rotíferos) | BSN48, alimento en escamas (o rotíferos) | BSN, una vez al día; alimento en escamas dos veces al día; o alimento en escamas y rotíferos una vez al día | No procede | 6-7 días tras el desove |
| **De estuario y marina:** | | | | | | |
| ***Cyprinodon variegatus*** Petota | BSN, alimento en escamas, FBS | BSN | BSN48 | 2-3 veces al día | No procede | Un día tras la eclosión/etapa de nadar hacia arriba |
| **Menidia sp.** Pejerrey | BSN48, alimento en escamas | BSN | BSN48 | 2-3 veces al día | No procede | Un día tras la eclosión/etapa de nadar hacia arriba |

*Leyenda:*

(*) Debe ofrecerse comida hasta que los peces estén saciados. La comida no consumida y los excrementos deberán evacuarse siempre que sea necesario para evitar la acumulación de desechos.

FBS Artemia salina congelada; adultos de *Artemia* sp.

BSN Nauplios de artemia salina; recién eclosionados

BSN48 Nauplios de artemia salina; 48 horas de vida

([a]) No es necesario alimentar a las larvas con saco vitelino.

([b]) Filtrado de un cultivo mixto.

([c]) Gránulos procedentes de un proceso de fermentación.

▼M7

*Apéndice 4*

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ADECUADA**

| Componente | Límite de concentración |
|---|---|
| Partículas | 5 mg/l |
| Carbono orgánico total | 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | 1 µg/l |
| Cloro residual | 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | 25 ng/l |
| Aluminio | 1 µg/l |
| Arsénico | 1 µg/l |
| Cromo | 1 µg/l |
| Cobalto | 1 µg/l |
| Cobre | 1 µg/l |
| Hierro | 1 µg/l |
| Plomo | 1 µg/l |
| Níquel | 1 µg/l |
| Cinc | 1 µg/l |
| Cadmio | 100 ng/l |
| Mercurio | 100 ng/l |
| Plata | 100 ng/l |

▼M7

*Apéndice 5*

## ORIENTACIONES ESTADÍSTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA NOEC

**Consideraciones generales**

Los recipientes replicados en paralelo (réplicas) constituyen la unidad de análisis. De este modo, para obtener mediciones continuas, como el tamaño, se deberá calcular la media o mediana de las réplicas y estos valores serán los datos que se usen para el análisis. Habrá que demostrar la potencia de los ensayos utilizados, preferiblemente a partir de una base de datos históricos de cada laboratorio. Para cada parámetro deberá indicarse el efecto sobre el tamaño que pueda detectarse con una potencia del 75-80 % junto con la prueba estadística que se usará.

Las bases de datos disponibles en el momento de elaborar el presente método de ensayo indican la potencia que podrá alcanzarse con los procedimientos estadísticos recomendados. Cada laboratorio deberá demostrar su capacidad para cumplir con este requisito de potencia, bien realizando sus propios análisis de potencia o bien probando que el coeficiente de variación (CV) de cada respuesta no sobrepasa el percentil 90 de los CV utilizados para elaborar las directrices de ensayo. El cuadro 1 recoge dichos CV. Si solo se dispone de las medias o medianas de las réplicas, se podrá ignorar el CV intra-réplicas.

*Cuadro 1*

**Percentil 90 de los CV de las especies de agua dulce seleccionadas**

| Especies | Respuesta | CV entre réplicas | CV intra-réplicas |
|---|---|---|---|
| Trucha arcoiris | Longitud | 17,4 | 9,8 |
| | Peso | 10,1 | 28 |
| Pez cabeza gorda | Longitud | 16,9 | 13,5 |
| | Peso | 11,7 | 38,7 |
| Pez cebra | Longitud | 43,7 | 11,7 |
| | Peso | 11,9 | 32,8 |

En casi todas las pruebas estadísticas empleadas para evaluar los estudios de toxicología en laboratorios, las comparaciones relevantes son las que se hacen entre los grupos de tratamiento y el testigo. Por esta razón, no es apropiado exigir una prueba F de ANOVA significativa antes de usar la prueba de Dunnett o de Williams o una prueba de Kruskal-Wallis significativa antes de utilizar la prueba de Jonckheere-Terpstra, Mann-Whitney o Dunn (Hochberg y Tamhane 1987, Hsu 1996, Dunnett 1955, 1964, Williams 1971, 1972, 1975, 1977, Robertson *et al.* 1988, Jonckheere 1954, Dunn 1964).

La prueba de Dunnett incluye un ajuste de multiplicidad y, al emplear la prueba F como filtro, los porcentajes de falsos positivos y falsos negativos podrían verse afectados de forma negativa. Asimismo, las pruebas de ajuste secuencial de Williams y Jonckheere-Terpstra con un nivel de significación del 0,05 en cada paso conservan un porcentaje global de falsos positivos del 5 %. Este porcentaje y la potencia de las pruebas pueden verse afectadas de forma negativa si se usa la prueba F o la prueba de Kruskal-Wallis como filtro. Debe ajustare la multiplicidad de las pruebas de Mann-Whitney y de Dunn; se recomienda el ajuste de Bonferroni-Holm.

En las directrices de la OCDE (2006) se recoge una exhaustiva discusión sobre la mayoría de las recomendaciones para las pruebas de hipótesis y la verificación de supuestos en las que se basan estos ensayos; además, incluyen una amplia bibliografía.

▼M7

**Tratamiento de los testigos cuando se usa un disolvente**

Si se usa un disolvente, deberán incluirse un testigo de agua de dilución y un testigo de disolvente. Los dos testigos deben compararse para cada respuesta y, si no se observa una diferencia significativa entre ambos, deberán combinarse para realizar un análisis estadístico. Si se observa una diferencia significativa, el testigo de disolvente deberá utilizarse para determinar la NOEC o estimar la $EC_x$ y no se utilizará el testigo del agua. Véanse las restricciones de los criterios de validez en el punto 7.

Respecto a la longitud, el peso, la tasa de eclosión de huevos, de mortalidad de larvas o de larvas anómalas y el primero o el último día de eclosión o de la etapa de nadar hacia arriba, se debe realizar una prueba T o una prueba de Mann-Whitney para comparar el testigo de agua de dilución y el testigo de disolvente al nivel de significación del 0,05, ignorando todos los grupos de tratamiento. Los resultados de estas pruebas deberán recogerse en el informe.

**Mediciones de tamaño (longitud y peso)**

Los valores de longitud y peso de cada pez pueden tener una distribución normal o una distribución logarítmica normal. En ambos casos, las medias de las réplicas tienden hacia una distribución normal debido al teorema del límite central; esto se confirma con datos de más de 100 estudios de las primeras fases de vida de tres especies de agua dulce. Por otro lado, cuando los datos o las bases de datos históricos sugieran una distribución logarítmica normal de los valores de los tamaños de cada pez, se podrá calcular el logaritmo de la media de las réplicas de los valores de cada pez y los datos del análisis podrán ser los antilogaritmos de dichos logaritmos de la media de las réplicas.

Se deberán evaluar los datos en cuanto a la coherencia con una distribución normal y la homogeneidad de la varianza. Para ello, se utilizarán los valores residuales de un modelo ANOVA con la concentración como la única variable de tipo explicativa. Podrá llevarse a cabo una determinación visual a partir de diagramas de dispersión e histogramas o usarse diagramas de tallos y hojas. También se podrá emplear una prueba en regla, como la de Shapiro-Wilk o Anderson-Darling. La coherencia con la homogeneidad de la varianza puede evaluarse mediante un análisis visual del mismo diagrama de dispersión o de manera formal con la prueba de Levene. Solo habrá que evaluar la normalidad o la homogeneidad de la varianza en las pruebas paramétricas (p. ej., la de Williams o Dunnett).

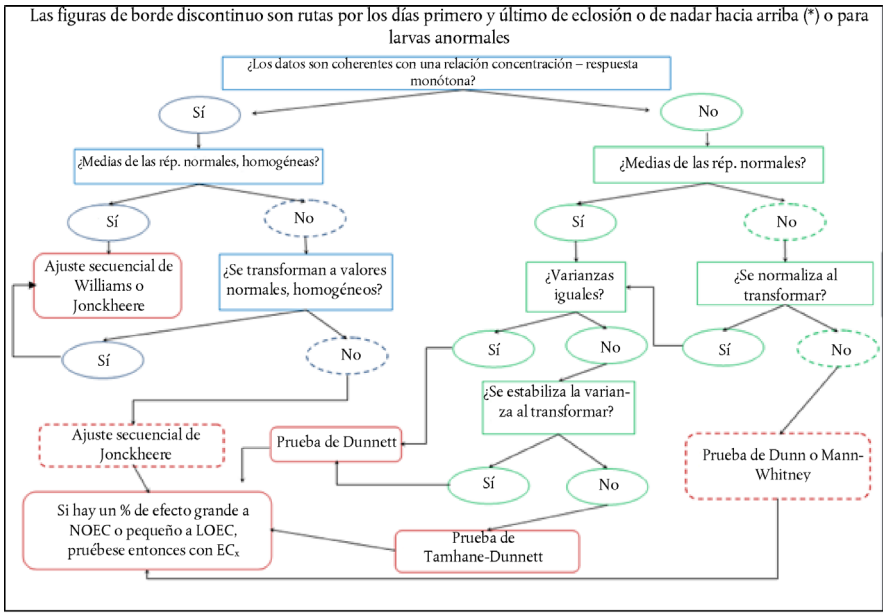
Se debe prestar especial atención a los posibles valores anómalos y a sus efectos sobre el análisis. Puede usarse la prueba de valores anómalos de Tukey e inspeccionar de forma visual las mismas representaciones gráficas de los valores residuales mencionados anteriormente. Cabe recordar que los objetos de observación son las réplicas enteras, por lo que solo se deberá omitir un valor anómalo del análisis tras una cuidadosa evaluación.

Las pruebas estadísticas que hacen uso de las características del diseño experimental y de la expectativa biológica son las pruebas de ajuste secuencial, como las de Williams y Jonckheere-Terpstra. Estas pruebas asumen una relación concentración-respuesta monótona y deberá evaluarse la coherencia de los datos con dicho supuesto. Puede hacerse de forma visual mediante un diagrama de dispersión de la media de las réplicas frente a la concentración de ensayo. Será útil superponer el diagrama de dispersión con un diagrama lineal por tramos que una las medias de concentración ponderadas por el tamaño de las muestras de las réplicas. Una gran desviación de la monotonicidad de dicho diagrama lineal indicaría la posibilidad de tener que utilizar pruebas que no sean de tendencia. Pueden emplearse también pruebas en regla. Una sencilla prueba en regla consiste en calcular los contrastes lineales y cuadráticos de las medias de la concentración. Si el contraste cuadrático es significativo y el contraste lineal no lo es, puede haber un problema de monotonicidad que debe analizarse en profundidad mediante las representaciones gráficas. Cuando la normalidad o la homogeneidad de la varianza puedan suponer un problema, estos contrastes pueden crearse a partir de datos transformados por orden de rangos. Podrán utilizarse otros procedimientos, como la prueba de monotonicidad de Bartholomew, aunque añadirían complejidad.

▼M7

**Figura 2**

*Diagrama de flujo de la NOEC de las mediciones de tamaño (longitud y peso)*




(*) Estas respuestas nunca satisfacen los supuestos de los análisis o modelos paramétricos.

A menos que los datos no sean coherentes con los requisitos de estas pruebas, la NOEC se determinará con una aplicación de ajuste secuencial de la prueba de Williams o de Jonckheere-Terpstra. Las directrices de la OCDE (2006) ofrecen información sobre dichos procedimientos. Cuando los datos no sean coherentes con los requisitos de una prueba de tendencia de ajuste secuencial, se podrá utilizar la prueba de Dunnett o de Tamhane-Dunnett (T3); ambas pruebas incluyen ajustes de multiplicidad. Estas pruebas suponen que hay normalidad y, en el caso de Dunnet, homogeneidad de la varianza. Cuando no se cumplan las condiciones, se podrá utilizar la prueba no paramétrica de Dunn. En las directrices de la OCDE (2006) se incluye información sobre todas estas pruebas. La figura 2 ofrece una visión general para ayudar a elegir una prueba.

**Tasa de eclosión de los huevos y de supervivencia de las larvas**

Los datos son las proporciones de huevos que han eclosionado o de larvas que sobreviven en cada réplica. Dichas proporciones deben evaluarse en cuanto a su variación extra-binomial, que suele ser común pero no universal para tales mediciones. El diagrama de flujo de la figura 3 puede servir de orientación a la hora de seleccionar una prueba. En el texto se ofrecen descripciones detalladas.

Habitualmente se usan dos pruebas; la prueba de Tarone C(α) (Tarone, 1979) y la prueba de ji cuadrado; se aplica cada una por separado a cada concentración de ensayo. Si se detecta variación extra-binomial incluso en solo una concentración de ensayo, deberán usarse métodos que se adapten a ello.

**Fórmula 1**

*Prueba C (α) de Tarone (Tarone 1979)*

$$Z = \frac{\sum_{j=1}^{m} \frac{(x_j - n_j \hat{p})^2}{\hat{p}(1-\hat{p})} - \sum_{j=1}^{m} n_j}{\left\{2\sum_{j=1}^{m} n_j(n_j - 1)\right\}^{1/2}}$$

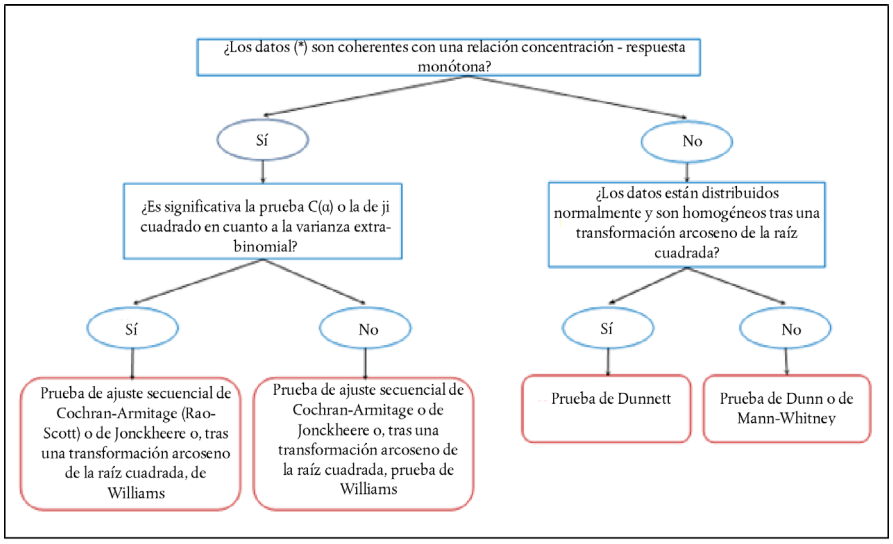
donde $\hat{p}$ es la proporción media de una concentración determinada**,** **m** es el número de recipientes en paralelo, $\mathbf{n_j}$ es el número de sujetos en la réplica **j**, y $\mathbf{x_j}$ es el número de sujetos en dicha réplica que responden al tratamiento, p. ej.,

▼M7

que no han eclosionado o están muertos. Esta prueba se aplica a cada concentración por separado. Aunque puede verse como una prueba de ji cuadrado ajustada, las simulaciones de potencia limitadas efectuadas por Tarone demostraron que es más potente que una prueba de ji cuadrado.

**Figura 3**

*Diagrama de flujo de la NOEC de la tasa de eclosión de huevos y de mortalidad de larvas*




(*) Los datos son la proporción por réplica.

Cuando no exista un indicio significativo de variación extra-binomial, podrá usarse la prueba de ajuste secuencial de Cochran-Armitage. Esta prueba ignora las réplicas, por ello cuando existe tal indicio, se recomienda usar el ajuste de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage (RSCA), que tiene en cuenta las réplicas, los tamaños de las réplicas y la variación extra-binomial. Pueden utilizarse otras pruebas, como la prueba de ajuste secuencial de Williams y Jonckheere-Terpstra y la prueba de Dunnett, como se describe para las mediciones de los tamaños. Estas pruebas se aplican haya o no variación extra-binomial, pero a veces pueden tener una menor potencia (Agresti 2002, Morgan 1992, Rao y Scott 1992, 1999, Fung *et al.* 1994, 1996).

**Primer o último día de eclosión o de la etapa de nadar hacia arriba**

La respuesta es un número entero, que da el día del ensayo en el que se detecta la observación indicada en un recipiente en paralelo determinado. Por lo general, la gama de valores es muy limitada y suele haber altas proporciones de valores vinculados, p. ej., se observa el mismo primer día de eclosión en todas las réplicas testigo y, quizás, en una o dos de las concentraciones de ensayo bajas. Las pruebas paramétricas, como las de Williams y Dunnett, no resultan adecuadas para estos datos. A menos que se disponga de indicios de una importante ausencia de monotonicidad, puede usarse la prueba de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra, que es muy potente para detectar los efectos del producto problema. En caso contrario, podrá utilizarse la prueba de Dunn.

**Anomalías de las larvas**

La respuesta es el recuento de larvas en las que se ha observado algún aspecto anómalo. Con frecuencia, esta respuesta es de baja incidencia y presenta algunos de los mismos problemas que el primer día de eclosión, ya que a veces puede ser errática en cuanto a la relación concentración-respuesta. Si los datos siguen al menos una forma aproximada de concentración monótona, la prueba de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra resulta eficaz para detectar los efectos. En caso contrario, podrá utilizarse la prueba de Dunn.

▼**M7**

BIBLIOGRAFÍA

Agresti, A. (2002); Categorical Data Analysis, second edition, Wiley, Hoboken.

Dunnett C. W. (1955); A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control, J. American Statistical Association 50, 1096-1121.

Dunn O. J. (1964); Multiple Comparisons Using Rank Sums, Technometrics 6, 241-252.

Dunnett C. W. (1964); New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics 20, 482-491.

Fung, K.Y., D. Krewski, J.N.K. Rao, A.J. Scott (1994); Tests for Trend in Developmental Toxicity Experiments with Correlated Binary Data, Risk Analysis 14, 639-648.

Fung, K.Y, D. Krewski, R.T. Smythe (1996); A comparison of tests for trend with historical controls in carcinogen bioassay, Canadian Journal of Statistics 24, 431-454.

Hochberg, Y. and A. C. Tamhane (1987); Multiple Comparison Procedures, Wiley, New York.

Hsu, J.C. (1996); Multiple Comparisons: Theory and Methods; Chapman and Hall/CRC Press, Boca Raton.

Jonckheere A. R. (1954); A distribution-free k-sample test against ordered alternatives, Biometrika 41, 133.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

OCDE (2006). Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series on Testing and Assessment, No. 54. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris..

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1992) — A simple method for the analysis of clustered binary data, Biometrics 48, 577-585.

Rao J.N.K. and Scott A.J. (1999) — A simple method for analyzing overdispersion in clustered Poisson data, Statistics in Medicine 18, 1373-1385.

Robertson, T., Wright F.T. and Dykstra R.L. (1988); Order restricted statistical inference, Wiley.

Tarone, R.E. (1979); Testing the goodness of fit of the Binomial distribution, Biometrika 66, 585-590.

Williams D.A. (1971); A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics 27, 103-117.

Williams D.A. (1972); The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics 28, 519-531.

Williams D. A. (1975); The Analysis of Binary Responses from Toxicological Experiments Involving Reproduction and Teratology, Biometrics 31, 949-952.

Williams D.A. (1977); Some inference procedures for monotonically ordered normal means, Biometrika 64, 9-14.

▼M7

*Apéndice 6*

## ORIENTACIONES ESTADÍSTICAS PARA LAS ESTIMACIONES DE LA REGRESIÓN

### Consideraciones generales

Las observaciones utilizadas para ajustar un modelo son las medias de las réplicas (longitud y peso) o las proporciones de las réplicas (eclosión de huevos y mortalidad de larvas) (OCDE 2006).

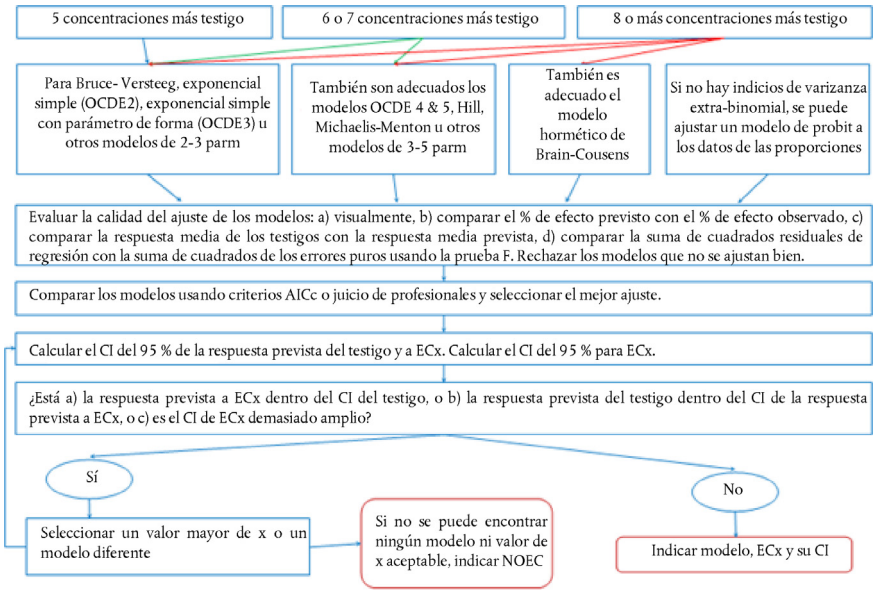
Por lo general, se aconseja la regresión ponderada utilizando como peso el tamaño de las muestras de las réplicas. Se pueden emplear otros esquemas de ponderación, como la ponderación por respuesta media prevista o una combinación de esta ponderación y la del tamaño de las muestras de las réplicas. No se recomienda la ponderación mediante la inversa de la varianza de una misma muestra dentro de la concentración (Bunke et al. 1999, Seber y Wild, 2003, Motulsky y Christopoulos 2004, Huet *et al.* 2003).

Cualquier transformación de las respuestas antes del análisis debe mantener la independencia de las observaciones y la ECx y sus límites de confianza deben expresarse en las unidades originales de medida, en lugar de en las unidades transformadas. Por ejemplo, un cambio del 20 % en el logaritmo de la longitud no equivale a un cambio del 20 % en la longitud (Lyles *et al.* 2008, Draper y Smith 1999).

El diagrama de flujo de la figura 4 ofrece una visión general de las estimaciones de la $EC_x$. Los detalles se describen más adelante.

*Figura 4*

**Diagrama de flujo de las estimaciones de la $EC_x$ de la longitud media por réplica del peso, o de la proporción de eclosiones de huevos o mortalidad de las larvas (véase el texto para más detalles)**




### Consideraciones sobre la tasa de eclosión de huevos y de mortalidad de larvas

Para la eclosión de huevos y la mortalidad de larvas, por lo general lo mejor es ajustar un modelo decreciente, a menos que se esté ajustando un modelo de probit, como se describe más adelante. Es decir, conviene crear un modelo para la proporción de huevos que no eclosionan o de larvas que mueren. El motivo de ello es que la ECx se refiere a una concentración a la que hay un cambio igual al x % de la respuesta media del testigo. Si el 5 % de los huevos

▼M7

testigo no consiguen eclosionar y se crea un modelo de la incapacidad de eclosionar, la EC20 se refiere a una concentración a la que se produce una variación del 20 % del 5 % de los huevos testigo no eclosionados, lo que supone una variación de 0,2*0,05 = 0,01 o 1 punto porcentual hasta una tasa de no eclosión de los huevos del 6 %. Una variación tan pequeña no se puede estimar de forma significativa a partir de los datos disponibles y no es biológicamente importante. Mientras que si se crea un modelo de la proporción de huevos que eclosionan, la proporción del testigo será del 95 % en este ejemplo y una reducción del 20 % con respecto a la media del testigo supondría una variación de 0,95*0,2 = 0,18, con lo que la tasa de eclosión pasaría del 95 % al 77 % (= 95-18); la concentración que produce dichos efectos puede estimarse y probablemente sea de más interés. No se trata de un problema con las mediciones de tamaño, aunque unos efectos adversos sobre el tamaño suelen traducirse en una disminución de la talla.

**Modelos relacionados con el tamaño (longitud o peso) y la tasa de eclosión de huevos o de supervivencia de las larvas**

Excepto el modelo hormético de Brain-Cousens, todos estos modelos se describen y recomiendan en las directrices de la OCDE (2006). También se discuten los experimentos de ecotoxicidad en Slob de los llamados modelos OCDE 2-5 (2002). Existen, por supuesto, muchos otros modelos que pueden resultar de utilidad. Bunke, *et al.* (1999) enumeran los muchos modelos que no se incluyen en el presente documento y ofrecen un gran número de referencias a otros modelos. Los modelos indicados a continuación se consideran especialmente adecuados en experimentos de ecotoxicidad y se han usado ampliamente.

*Con 5 concentraciones de ensayo más un testigo*

— Bruce-Versteeg

— Exponencial simple (OCDE 2)

— Exponencial con parámetro de forma (OCDE 3)

— Exponencial simple con límite inferior (OCDE 4)

*Con 6 concentraciones de ensayo como mínimo más un testigo*

— Exponencial con parámetro de forma y límite inferior (OCDE 5)

— Michaelis-Menten

— Hill

Cuando existen indicios visuales de hormesis (poco probable en caso de éxito en la eclosión de huevos o de supervivencia de las larvas, pero se observa a veces con el tamaño):

— Modelo hormético de Brain-Cousens; Brain y Cousens (1989)

**Otros modelos relacionados con la tasa de huevos no eclosionados y de mortalidad de larvas**

— Si no hay indicios de variación extra-binomial, se pueden ajustar modelos de incremento de parámetros para estas respuestas mediante modelos de probit (o logísticos); la incidencia del testigo se estima en el ajuste del modelo. Este método no es el método de preferencia, ya que toma el sujeto, y no la réplica, como unidad de análisis (Morgan 1992, O'Hara Hines y Lawless 1993, Collett 2002, 2003).

**Calidad del ajuste de un solo modelo**

— Comparar visualmente los porcentajes de disminución observados y previstos a cada concentración de ensayo (Motulsky y Christopoulos 2004, Draper y Smith 1999).

— Comparar los cuadrados medios de los errores de regresión y los cuadrados medios de los errores puros mediante una prueba F (Draper y Smith 1999).

— Verificar que cada término del modelo es significativamente diferente de cero (es decir, determinar si todos los términos del modelo son importantes) (Motulsky y Christopoulos 2004).

▼M7

— Gráficas de los valores residuales de la regresión frente a la concentración de ensayo, posiblemente sobre una escala logarítmica de la concentración. No debe haber ningún patrón para esta representación gráfica; los puntos deberán estar dispersos aleatoriamente sobre una línea horizontal a la altura cero.

— Deben evaluarse la normalidad y la homogeneidad de la varianza de los datos, como se indica en el apéndice 5.

— Además, la normalidad de los valores residuales del modelo de regresión debe evaluarse siguiendo los mismos métodos que se indican en el apéndice 5 para los valores residuales del ANOVA.

**Comparación de los modelos**

— Utilizar los criterios AICc de Akiake. Unos valores AICc más pequeños denotan un mejor ajuste y si AICc(B)-AICc(A) ≥ 10, el modelo A es casi seguramente mejor que el modelo B (Motulsky y Christopoulos 2004).

— Comparar visualmente los dos modelos para ver cómo responden a los criterios de un solo modelo indicados anteriormente.

— Se aconseja seguir el principio de parsimonia, según el cual se utilizará el modelo más simple que ajuste los datos razonablemente bien (Ratkowsky 1993, Lyles et al. 2008).

**Calidad de la estimación de $EC_x$**

El intervalo de confianza (CI) de la $EC_x$ no debe ser demasiado amplio. Debe aplicarse el juicio estadístico para decidir la amplitud del intervalo de confianza y que la ECx siga siendo útil. Las simulaciones de los modelos de regresión ajustados a los datos relacionados con la eclosión de los huevos y el tamaño muestran que alrededor del 75 % de los intervalos de confianza de la $EC_x$ (x = 10, 20 o 30) no abarcan más de dos concentraciones de ensayo. Este hecho nos da una idea general de lo que es aceptable y factible. Numerosos autores han afirmado que es necesario indicar los intervalos de confianza de todos los parámetros del modelo y que, cuando dichos intervalos de confianza son amplios, los modelos son inaceptables (Ott y Longnecker 2008, Alvord y Rossio 1993, Motulsky y Christopoulos 2004, Lyles *et al.* 2008, Seber y Wild 2003, Bunke *et al.* 1999, Environnement Canada, 2005).

El intervalo de confianza de $EC_x$ (o de cualquier otro parámetro del modelo) no debe contener el valor nulo (cero) (Motulsky y Christopoulos 2004). Se trata del equivalente en modelos de regresión a la diferencia significativa mínima que se suele citar en los enfoques de verificación de hipótesis (Wang *et al*. 2000, por ejemplo). Corresponde igualmente al intervalo de confianza de las respuestas medias a la LOEC que no contienen la media del testigo. Cabe preguntarse si las estimaciones de los parámetros son científicamente plausibles. Por ejemplo, si el intervalo de confianza de y0 es ± 20 %, no es plausible ninguna estimación de $EC_{10}$. Si el modelo prevé un efecto del 20 % a una concentración C y si el efecto máximo observado a la concentración C y a las concentraciones inferiores es del 10 %, la $EC_{20}$ no es plausible (Motulsky y Christopoulos 2004, Wang *et al.* 2000, Environnement Canada, 2005).

La $EC_x$ no debe extrapolarse fuera de la gama de concentraciones positivas (Draper y Smith 1999, OCDE 2006). Por ejemplo, una orientación general podría ser que la $EC_x$ no esté más de un 25 % aproximadamente por debajo de la concentración de ensayo más baja ni por encima de la concentración de ensayo más alta.

BIBLIOGRAFÍA

Alvord, W.G., Rossio, J.L. (1993); Determining confidence limits for drug potency in immunoassay, Journal of Immunological Methods 157, 155-163.

Brain P. and Cousens R. (1989); An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed res. 29: 93-96.

▼**M7**

Bunke, O., Droge, B. and Polzehl, J. (1999). Model selection, transformations and variance estimation in nonlinear regression. *Statistics* 33, 197-240.

Collett, D. (2002); Modelling Binary Data, second edition, Chapman and Hall, London.

Collett, D. (2003); Modelling Survival Data in Medical Research, second edition, Chapman and Hall, London.

Draper, N.R. and Smith, H. (1999); Applied Regression Analysis, third edition. New York: John Wiley & Sons.

Environment Canada (2005); Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Tests, Report EPS 1/RM/46

Huet, S., A. Bouvier, M.-A. Poursat, E. Jolivet (2003); Statistical Tools for Nonlinear Regression: A Practical Guide with S-PLUS and R Examples, Springer Series in Statistics, New York.

Lyles, R. H., C. Poindexter, A. Evans, M. Brown, and C.R. Cooper (2008); Nonlinear Model-Based Estimates of IC50 for Studies Involving Continuous Therapeutic Dose-Response Data, *Contemp Clin Trials*. 2008 November; 29(6): 878-886.

Morgan, B.J.T. (1992); Analysis of Quantal Response Data, Chapman and Hall, London.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2004); Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting, Oxford University Press, USA.

O'Hara Hines, R. J. and J. F. Lawless (1993); Modelling Overdispersion in Toxicological Mortality Data Grouped over Time, *Biometrics* Vol. 49, pp. 107-121

OCDE (2006); Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: A guidance to application. Series Testing and Assessment, No. 54, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD, Paris.

Ott, R.L., M.T. Longnecker, An Introduction to Statistical Methods and Data Analysis, sixth edition, 2008, Brooks-Cole, Belmont, CA

Ratkowsky, D.A. (1993); Principles of nonlinear regression, Journal of Industrial Microbiology 12, 195-199.

Seber, G.A.F., C.J. Wild, Nonlinear Regression, Wiley, 2003

Slob W. (2002); Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci., 66, 298-312

Wang, Q., D.L. Denton, and R. Shukla (2000); Applications and Statistical Properties Of Minimum Significant Difference-Based Criterion Testing In a Toxicity Testing Program, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 19, pp. 113–117, 2000.

▼M7

## C.48. ENSAYO DE REPRODUCCIÓN DE PECES A CORTO PLAZO

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo reproduce las directrices de ensayo (TG) 229 de la OCDE (2012). La necesidad de desarrollar y validar un ensayo en peces capaz de detectar productos con actividad endocrina radica en la preocupación de que los niveles medioambientales de ciertos productos puedan provocar efectos adversos tanto en los seres humanos como en la vida silvestre, debido a la interacción de dichos productos con el sistema endocrino. En 1998, la OCDE promovió una actuación de alta prioridad orientada a revisar las directrices existentes, así como a elaborar otras nuevas para el cribado y la evaluación de los alteradores endocrinos potenciales. Una faceta de esta actuación consistió en elaborar las directrices del ensayo para el cribado de productos activos sobre el sistema endocrino de especies de peces. El ensayo de reproducción de peces a corto plazo se ha sometido a un amplio programa de validación, el cual consiste en varios estudios interlaboratorios con productos seleccionados con el objeto de demostrar la pertinencia y la fiabilidad del ensayo en términos de detección de productos que afecten a la reproducción de peces mediante varios mecanismos, incluidas las modalidades endocrinas (1, 2, 3, 4, 5). Todos los parámetros de las directrices de ensayo de la OCDE se han validado en el pez cabeza gorda y se ha validado un subconjunto de parámetros en el medaka (vitelogenina y caracteres sexuales secundarios) y el pez cebra (vitelogenina). El trabajo de validación ha sido revisado en parte por un grupo de expertos designados por los Coordinadores Nacionales del Programa de Directrices de Ensayo de la OCDE (6) y por un grupo de expertos independientes encargados por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (29). El ensayo no se ha diseñado para identificar mecanismos específicos de alteración hormonal, ya que los animales del ensayo poseen un eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG) intacto, que puede responder a los productos que afectan a dicho eje en diferentes niveles.

2. El presente método describe un ensayo de cribado in vivo en el que peces macho sexualmente maduros y peces hembra que están desovando se mantienen juntos y se exponen a un producto durante una parte limitada de su ciclo de vida (veintiún días). Al término del periodo de exposición de veintiún días, se miden dos parámetros biomarcadores en machos y hembras que sirven de indicadores de la actividad endocrina del producto problema; estos parámetros son la vitelogenina y los caracteres sexuales secundarios. La vitelogenina se mide en el pez cabeza gorda, el medaka y el pez cebra, mientras que los caracteres sexuales secundarios se miden en el pez cabeza gorda y el medaka. Además, la fecundidad cuantitativa se supervisa a diario durante todo el ensayo. También se conservan las gónadas y la histopatología podrá evaluarse para valorar la capacidad de reproducción de los animales de ensayo y contribuir a la ponderación de las pruebas de otros parámetros.

3. Este bioensayo sirve de ensayo de cribado reproductivo *in vivo* y su aplicación debe considerarse en el contexto del OECD Conceptual Framework for the Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals (Marco conceptual de la OCDE para el ensayo y evaluación de los alteradores endocrinos) (30). En este marco conceptual, se propone el ensayo de reproducción de peces a corto plazo en el nivel 3 como ensayo in vivo que proporciona datos sobre las rutas y mecanismos endocrinos seleccionados.

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

4. La vitelogenina (VTG) se produce normalmente en el hígado de los vertebrados ovíparos hembra como respuesta a los estrógenos endógenos circulantes. Es un precursor de las proteínas de la yema de huevo y, una vez que se produce en el hígado, viaja a través del torrente sanguíneo hasta el ovario, donde los huevos en desarrollo la absorben y modifican. La vitelogenina apenas se detecta en el plasma de los peces hembra inmaduros y de los machos porque no tienen suficientes estrógenos circulantes. No obstante, el hígado puede sintetizar y secretar vitelogenina como respuesta a la estimulación estrogénica exógena.

▼M7

5. La medición de la vitelogenina sirve para detectar productos con distintos mecanismos de acción estrogénica. La detección de productos estrogénicos es posible gracias a la medición de la inducción de vitelogenina en los peces macho, lo cual ha quedado suficientemente documentado en los estudios revisados por expertos científicos [por ejemplo, (7)]. La inducción de vitelogenina también ha quedado demostrada tras la exposición a andrógenos aromatizables (8, 9). Una reducción del nivel circulante de estrógenos en las hembras, por ejemplo mediante la inhibición de la aromatasa que convierte el andrógeno endógeno en el estrógeno natural 17β-estradiol, provoca una disminución del nivel de VTG, lo cual se utiliza para detectar productos con propiedades inhibidoras de la aromatasa (10, 11). La relevancia biológica de la respuesta de vitelogenina tras la inhibición de estrógenos o de la aromatasa ha quedado establecida y se ha documentado ampliamente. Sin embargo, es posible que la producción de VTG en las hembras también pueda verse afectada por la toxicidad general y por mecanismos de acción tóxicos no endocrinos como, por ejemplo, la hepatotoxicidad.

6. Se ha logrado elaborar varios métodos de medición de manera satisfactoria al tiempo que se han armonizado para el uso rutinario. Este es el caso de los métodos de enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) específicos para cada especie, que usan la inmunoquímica para la cuantificación de la VTG producida en pequeñas muestras sanguíneas o hepáticas recogidas en distintos peces (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18). Se recogen muestras sanguíneas de pez cabeza gorda, homogeneizados de cabeza/cola o muestras sanguíneas de pez cebra, y muestras hepáticas de medaka para medir la VTG. En el caso del medaka existe una buena correlación entre la VTG medida en la sangre y en el hígado (19). En el apéndice 6 se recogen los procedimientos recomendados para la recogida de muestras para el análisis de la VTG. Hay una gran variedad de juegos de medición de la VTG, los cuales deben basarse en un método ELISA validado específico para cada especie.

7. Los caracteres sexuales secundarios de los peces macho de determinadas especies son cuantificables y visibles externamente, además de responder a los niveles circulantes de andrógenos endógenos. Este es el caso del pez cabeza gorda y del medaka, pero no así del pez cebra, que no posee caracteres sexuales secundarios cuantificables. Las hembras conservan la capacidad de desarrollar caracteres sexuales secundarios masculinos tras su exposición a productos androgénicos en el agua. Hay varios estudios disponibles en la bibliografía científica que documentan este tipo de respuesta en el pez cabeza gorda (20) y el medaka (21). Una disminución de los caracteres sexuales secundarios en los machos debería interpretarse con cautela debido a la baja potencia estadística y debe basarse en opiniones de expertos y en la ponderación de las pruebas. Dada la ausencia de caracteres sexuales secundarios cuantificables que respondan a los productos con acción androgénica, hay limitaciones en el uso del pez cebra en este ensayo.

8. En el pez cabeza gorda, el principal indicador de exposición androgénica exógena es el número de tubérculos nupciales ubicados en el hocico del pez hembra. En el medaka, el número de tubérculos papilares constituye el principal marcador de exposición exógena a productos androgénicos en las hembras. En el apéndice 5A y el apéndice 5B se presentan los procedimientos recomendados para la evaluación de los caracteres sexuales en el pez cabeza gorda y el medaka, respectivamente.

9. El ensayo de peces de veintiún días incluye la evaluación de la producción de huevos cuantitativa y la conservación de las gónadas para realizar un examen histopatógico opcional. Algunas autoridades reguladoras pueden exigir este parámetro adicional para evaluar de forma más completa la capacidad reproductiva de los animales de ensayo, o en los casos en los que la vitelogenina y los caracteres sexuales secundarios no responden a la exposición al producto. Aunque algunos parámetros pueden tener un elevado valor diagnóstico (p. ej., la inducción de VTG en machos y la formación de tubérculos en hembras), no todos los parámetros (p. ej., fecundidad e histopatología gonadal) del ensayo tienen el objeto de identificar de forma inequívoca los mecanismos celulares de acción específicos. En cambio, todo el conjunto de parámetros permite extraer conclusiones con respecto a las posibles alteraciones endocrinas y, por tanto, proporciona una orientación para nuevos ensayos. Aunque no sea un criterio endocrino específico, la

▼M7

fecundidad, debido a su demostrada sensibilidad a una serie de productos activos endocrinos conocidos (5), es un importante parámetro que debe incluirse, ya que cuando este y otros parámetros no se ven afectados se tiene más certeza de que el compuesto no tiene probablemente actividad endocrina. Sin embargo, cuando la fecundidad se ve afectada, contribuirá en gran medida a la ponderación de las conclusiones deducidas de las pruebas. Más adelante en este método de ensayo se ofrecen directrices sobre la interpretación y aceptación de los resultados del ensayo.

10. Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. En el ensayo, se exponen juntos en recipientes de ensayo peces macho y hembra con capacidad reproductora. Su edad adulta y capacidad reproductora permite diferenciar claramente cada sexo y, por lo tanto, permite realizar un análisis de cada parámetro en relación con el sexo y garantiza su sensibilidad con respecto a los productos exógenos. Al finalizar el ensayo, el sexo se confirma con un examen macroscópico de las gónadas tras la apertura ventral del abdomen con unas tijeras. En el apéndice 2 se incluye un resumen de las condiciones relevantes del bioensayo. El ensayo comienza normalmente con muestras de peces de una población en situación de desove. No deben utilizarse animales senescentes. En la sección dedicada a la selección de los peces se incluyen pautas relativas a la edad de los peces y su capacidad reproductora. El ensayo se realiza con tres concentraciones de exposición al producto, así como con un testigo del agua y, en caso necesario, un testigo del disolvente. Se utilizan dos recipientes o réplicas por tratamiento para el pez cebra (cada recipiente contiene cinco machos y cinco hembras). Con el pez cabeza gorda se utilizan cuatro recipientes o réplicas por tratamiento (cada recipiente contiene dos machos y cuatro hembras). Esta distribución sirve para adaptarse al comportamiento territorial del pez cabeza gorda macho a la vez que para mantener una potencia suficiente del ensayo. Con el medaka se utilizan cuatro recipientes o réplicas por tratamiento (cada recipiente contiene tres machos y tres hembras). La exposición dura veintiún días y el muestreo de peces se lleva a cabo en el vigesimoprimer día de exposición. La fecundidad cuantitativa se supervisa a diario.

12. Cuando se realiza el muestreo el vigesimoprimer día, todos los animales son sacrificados de forma compasiva. Se miden los caracteres sexuales secundarios en el pez cabeza gorda y el medaka (véanse el apéndice 5A y el apéndice 5B); se recogen muestras de sangre para determinar la VTG en el pez cebra y el pez cabeza gorda; también se pueden recoger muestras de la cabeza o cola para determinar la VTG en el pez cebra (apéndice 6), se recogen muestras hepáticas para analizar la VTG en el medaka (apéndice 6); las gónadas se fijan en conjunto o se diseccionan para una posible evaluación histopatológica (22).

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DEL ENSAYO

13. Para que los resultados del ensayo sean aceptables, deben cumplirse las condiciones siguientes:

— la mortalidad en los testigos del agua (o del disolvente) no ha de superar el 10 % al final del periodo de exposición;

— la concentración de oxígeno disuelto ha de ser, al menos, del 60 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el periodo de exposición;

— en ningún momento del periodo de exposición la temperatura del agua debe variar en más de ± 1,5 °C entre los recipientes de ensayo y debe mantenerse en un intervalo de 2 °C dentro de las gamas establecidas para la especie de ensayo (apéndice 2);

— en ningún momento del periodo de exposición la temperatura del agua debe variar en más de ± 1,5 °C entre los recipientes de ensayo y debe mantenerse en un intervalo de 2 °C dentro de las gamas establecidas para la especie de ensayo (apéndice 2);

▼M7

— en ningún momento del periodo de exposición la temperatura del agua debe variar en más de ± 1,5 °C entre los recipientes de ensayo y debe mantenerse en un intervalo de 2 °C dentro de las gamas establecidas para la especie de ensayo (apéndice 2);

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

14. Se emplea el equipo común de laboratorio y, en particular:

(a) medidores de oxígeno y pH;

(b) equipo para determinar la dureza y la alcalinidad del agua;

(c) dispositivo adecuado de regulación de la temperatura, con supervisión preferiblemente continua;

(d) recipientes de material químicamente inerte y con una capacidad adecuada a la carga y la densidad de población recomendadas (véase el apéndice 2);

(e) sustrato de desove del pez cabeza gorda y del pez cebra (en el apéndice 4 figura la información necesaria);

(f) una balanza suficientemente exacta (esto es, exactitud de ± 0,5 mg).

**Agua**

15. Puede utilizarse para el ensayo toda agua en la que la especie de ensayo muestre unas tasas de crecimiento y supervivencia a largo plazo adecuadas. Su calidad ha de ser constante a lo largo de todo el ensayo. El pH se mantendrá entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de ± 0,5 unidades de pH. Deben tomarse muestras periódicamente para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación del producto problema). Conviene proceder a la determinación de los metales pesados (por ejemplo, Cu, Pb, Zn, Hg, Cd y Ni), aniones y cationes principales (por ejemplo, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, $Cl^{-}$, and $SO_4^{2-}$), plaguicidas (por ejemplo, organofosforados totales y organoclorados totales), carbono orgánico total y sólidos en suspensión, por ejemplo cada tres meses cuando se sepa que el agua de dilución es de calidad relativamente constante. Si se demuestra que la calidad del agua es constante al menos durante un año, los análisis pueden ser menos frecuentes y espaciarse más (por ejemplo, cada seis meses). En el apéndice 3 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable.

**Soluciones de ensayo**

16. Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación del producto problema en el agua de dilución con medios mecánicos (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Pueden emplearse columnas de saturación (columnas de solubilidad) para lograr la concentración adecuada de solución madre. No se recomienda usar un disolvente vehículo. Sin embargo, en el caso de que sea necesario usar un disolvente, debe llevarse un testigo del disolvente en paralelo y con la misma concentración de disolvente que en los tratamientos con el producto problema. Con productos difíciles, la mejor solución técnica puede ser el uso de disolvente. Debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre los ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas difíciles (23). La elección del disolvente vendrá determinada por las propiedades químicas de la sustancia o mezcla. El documento de orientación de la OCDE recomienda un máximo de 100 µl/l, que debe respetarse. Sin embargo, una revisión reciente (24) puso de relieve otras cuestiones relativas al uso de disolventes para realizar ensayos sobre la actividad endocrina. Por lo tanto, se recomienda que la concentración del disolvente, en caso necesario, se reduzca al mínimo siempre que sea técnicamente posible (esto dependerá de las propiedades fisicoquímicas del producto problema).

▼M7

17. Se utilizará un sistema de ensayo dinámico. Este tipo de sistemas aporta y diluye continuamente una solución madre del producto problema (por ejemplo, bomba dosificadora, diluidor proporcional o sistema saturador) para distribuir una serie de concentraciones en los recipientes de ensayo. Los caudales de las soluciones madre y del agua de dilución deben supervisarse con regularidad, preferiblemente todos los días, y no deben variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Debe evitarse el uso de tubos de plástico de baja calidad u otros materiales que puedan contener productos biológicamente activos. Al seleccionar el material para el sistema dinámico, debe tenerse en cuenta la posible adsorción del producto problema a este material.

**Preparación de los peces**

18. Los peces de ensayo deben seleccionarse de una población de laboratorio, preferentemente de una sola, que se mantenga al menos en las dos semanas antes del ensayo en condiciones de calidad del agua e iluminación similares a las del ensayo. Es importante que la tasa de carga y la densidad de población (las definiciones pueden consultarse en el apéndice 1) sean las adecuadas para la especie de ensayo utilizada (véase el apéndice 2).

19. Después de un periodo de adaptación de 48 horas, se registra la mortalidad y se aplican los criterios siguientes:

— si la mortalidad es superior al 10 % de la población en siete días: se rechaza todo el lote;

— si la mortalidad se halla entre el 5 y el 10 % de la población, se prolonga otros siete días el periodo de aclimatación; si durante este segundo periodo la mortalidad supera el 5 %, se rechaza todo el lote;

— si la mortalidad es inferior al 5 % de la población en siete días: se acepta el lote.

20. Los peces no deben recibir tratamiento terapéutico alguno durante el periodo de aclimatación, el periodo de preexposición ni el periodo de exposición.

**Preexposición y selección de los peces**

21. Se recomienda un periodo de preexposición de una o dos semanas, en el que los animales están en recipientes similares a los utilizados en el ensayo real. Los peces deben ser alimentados *ad libitum* durante todo el periodo de preparación y durante la fase de exposición. La fase de exposición comienza con peces adultos sexualmente dimórficos, procedentes de un suministro para laboratorio de animales maduros para la reproducción (por ejemplo, con caracteres sexuales secundarios claramente visibles, en lo que respecta al pez cabeza gorda y al medaka) y en desove activo. Únicamente a modo de orientación general (esto es, no debe tenerse en cuenta sin atender a la situación reproductora real de un lote de peces determinado), los peces cabeza gorda deben tener aproximadamente 20 (± 2) semanas de edad, suponiendo que se hayan criado a 25 ± 2 °C durante toda su vida. Los medaka deben tener aproximadamente 16 (± 2) semanas, suponiendo que se hayan criado a 25 ± 2 °C durante toda su vida. Los peces cebra deben tener aproximadamente 16 (± 2) semanas, suponiendo que se hayan criado a 26 ± 2 °C durante toda su vida. La producción de huevos debe evaluarse cada día durante la fase de exposición. Se recomienda observar el desove en todos los recipientes en paralelo antes de incluirlos en la fase de exposición del ensayo. Por ahora no se pueden proporcionar pautas cuantitativas sobre la producción de huevos diaria conveniente, pero es relativamente común observar un desove medio de >10 huevos/hembra/día para cada especie. Se deben colocar los recipientes según un esquema de agrupamiento aleatorizado de acuerdo con los resultados de producción de huevos, para asignar las réplicas a los diferentes niveles experimentales con el fin de garantizar una distribución de las réplicas equilibrada.

▼M7

DISEÑO DEL ENSAYO

22. Se utilizan tres concentraciones del producto problema, un testigo (agua) y, si es necesario, un testigo de disolvente. Los datos se pueden analizar con el objeto de determinar diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de los grupos de tratamiento y de los testigos. Estos análisis indicarán si son necesarios otros ensayos a largo plazo para determinar efectos adversos (es decir, supervivencia, desarrollo, crecimiento y reproducción) del producto, más que para su uso en la evaluación de riesgos (25).

23. En lo que respecta al pez cebra, en el vigesimoprimer día del experimento se realiza un muestreo de machos y hembras de cada nivel de tratamiento (cinco machos y cinco hembras en cada una de las dos réplicas) y de los testigos para medir la vitelogenina. En lo que respecta al medaka, en el vigesimoprimer día del experimento se realiza un muestreo de machos y hembras de cada nivel de tratamiento (tres machos y tres hembras en cada una de las cuatro réplicas) y de los testigos para medir la vitelogenina y los caracteres sexuales secundarios. En lo que respecta al pez cabeza gorda, en el vigesimoprimer día de exposición se realiza un muestreo de machos y hembras (dos machos y cuatro hembras en cada una de las cuatro réplicas) y de los testigos para medir la vitelogenina y los caracteres sexuales secundarios. Es necesario realizar una evaluación cuantitativa de la fecundidad y los tejidos gonadales deben fijarse en conjunto o diseccionados para su posible evaluación histopatológica, si procede.

**Selección de las concentraciones de ensayo**

24. A efectos de este ensayo, la concentración de ensayo máxima debe establecerse de acuerdo con la concentración máxima tolerada (en lo sucesivo, MTC, por sus siglas en inglés), la cual se determina mediante un ensayo de determinación de intervalo u otros datos de toxicidad, o fijarse en 10 mg/l o en la solubilidad máxima en agua, eligiéndose el valor que sea menor. La MTC se define como la concentración máxima de ensayo del producto que provoca una mortalidad inferior al 10 %. Con este planteamiento se asume que existen datos empíricos de toxicidad aguda u otros datos de toxicidad a partir de los cuales se puede estimar la MTC. La estimación de la MTC puede ser inexacta y, por lo general, debe aplicarse un juicio profesional.

25. Se requieren tres concentraciones de ensayo, separadas por un factor constante no superior a 10, así como un testigo del agua de dilución (y un testigo del disolvente si es necesario). Se recomienda emplear una gama de factores de separación entre 3,2 y 10.

PROCEDIMIENTO

**Selección y pesada de los peces**

26. Es importante que el peso de los peces varíe lo menos posible al inicio del ensayo. En el apéndice 2 figuran los intervalos de tamaño apropiados en cada una de las especies recomendadas para este ensayo. Para todo el lote de peces utilizado en el ensayo, el intervalo de pesos individuales de los peces macho y hembra al inicio del ensayo debe mantenerse, si es posible, en el ± 20 % de la media aritmética del peso del mismo sexo. Se recomienda pesar una submuestra de la población de peces antes del ensayo para calcular el peso medio.

**Condiciones de exposición**

*Duración*

27. La duración del ensayo es de veintiún días, tras un periodo de preexposición. El periodo de preexposición recomendado es de una o dos semanas.

*Alimentación*

28. Los peces deben ser alimentados *ad libitum* con alimentos adecuados (apéndice 2) a un ritmo suficiente para mantener la condición física. Debe tenerse cuidado para evitar el crecimiento microbiano y la turbidez del agua. Como pauta general, la ración diaria puede dividirse en dos o tres porciones iguales

▼M7

para realizar varias tomas al día y deben transcurrir al menos tres horas entre cada toma. Una sola ración mayor resulta aceptable, especialmente los fines de semana. La alimentación de los peces debe suprimirse durante las 12 horas anteriores a la toma de muestras o la autopsia.

29. Se debe evaluar la presencia de contaminantes en la comida de los peces, como plaguicidas organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o bifenilos policlorados (PCB). Deben evitarse los alimentos con un alto nivel de fitoestrógenos que puedan comprometer la respuesta del ensayo a agonistas estrogénicos conocidos (por ejemplo, el 17β-estradiol).

30. La comida sobrante y la materia fecal deben retirarse de los recipientes de ensayo al menos dos veces por semana, por ejemplo limpiando bien el fondo de cada recipiente con un sifón.

*Luz y temperatura*

31. El fotoperiodo y la temperatura del agua han de ser adecuados para la especie utilizada (apéndice 2).

**Frecuencia de los análisis y las mediciones**

32. Antes de que comience el periodo de exposición, debe garantizarse el funcionamiento correcto del sistema de distribución del producto. Deben estar bien establecidos todos los métodos analíticos, incluidos los conocimientos suficientes sobre la estabilidad química del sistema de ensayo. Durante el ensayo, las concentraciones del producto problema se determinan a intervalos regulares, de la siguiente manera: los caudales de diluyente y de solución madre del producto tóxico deben comprobarse preferentemente todos los días, pero al menos dos veces por semana, y no deben variar en más del 10 % a lo largo del ensayo. Se recomienda que las concentraciones reales de producto problema se midan en todos los recipientes al comienzo del ensayo y, posteriormente, cada semana.

33. Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. Sin embargo, si la concentración de producto problema en la solución se ha mantenido debidamente dentro del ± 20 % de la concentración nominal durante todo el ensayo, los resultados pueden basarse en los valores nominales o en los valores medidos.

34. En algunos casos puede estar indicado filtrar (por ejemplo, con un filtro de poros de 0,45 μm) o centrifugar las muestras. En caso necesario, el procedimiento recomendado es el centrifugado. Sin embargo, si se demuestra que el material del ensayo no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración.

35. Durante el ensayo deben medirse el oxígeno disuelto, la temperatura y el pH en todos los recipientes de ensayo, al menos una vez por semana. La dureza total y la alcalinidad deben medirse en los testigos y en uno de los recipientes con la concentración más alta al menos una vez por semana. La temperatura debe someterse preferentemente a supervisión continua al menos en un recipiente de ensayo.

**Observaciones**

36. En el transcurso del ensayo o al término del mismo, se evalúa una serie de respuestas generales (por ejemplo, la supervivencia) o biológicas (por ejemplo, los niveles de VTG). Se requiere una supervisión cuantitativa diaria de la fecundidad. A continuación se describen la medición y la evaluación de estos parámetros y su utilidad.

*Supervivencia*

37. Durante el periodo del ensayo deben examinarse diariamente los peces, registrar la mortalidad y retirar los peces muertos lo antes posible. Los peces muertos no deben ser reemplazados en los recipientes testigp ni en los de tratamiento. El sexo de los peces que mueran durante el ensayo debe determinarse mediante la evaluación macroscópica de las gónadas.

▼M7

*Comportamiento y aspecto*

38. Debe anotarse todo comportamiento anómalo (con respecto a los testigos), tales como signos de toxicidad general, incluida la hiperventilación, la descoordinación al nadar, la pérdida de equilibrio o una inactividad o alimentación atípicas. También deben indicarse las anomalías externas (por ejemplo, hemorragia o decoloración). Estos signos de toxicidad deben considerarse detenidamente durante la interpretación de los datos, ya que pueden indicar concentraciones a las que los biomarcadores de la actividad endocrina no resulten fiables. Estas observaciones sobre el comportamiento también pueden proporcionar información cualitativa útil para los posibles requisitos futuros de ensayos en peces. Por ejemplo, se ha observado agresividad territorial en machos normales o hembras masculinizadas del pez cabeza gorda expuestos a andrógenos, mientras que en el pez cebra el comportamiento característico del apareamiento y desove al amanecer se ha reducido u obstaculizado debido a una exposición estrogénica o antiandrogénica.

39. Como algunos elementos del aspecto (principalmente el color) pueden cambiar rápidamente con la manipulación, es importante que las observaciones cualitativas se realicen antes de retirar los animales del sistema del ensayo. La experiencia hasta la fecha con el pez cabeza gorda sugiere que algunos productos con actividad endocrina pueden, inicialmente, inducir cambios en las siguientes características externas: color del cuerpo (claro u oscuro), patrones de coloración (presencia de franjas verticales) y forma del cuerpo (zona de la cabeza y del pecho). Por lo tanto, deben realizarse durante el ensayo y al término del estudio observaciones del aspecto físico de los peces.

*Fecundidad*

40. Las observaciones diarias cuantitativas de desove deban registrarse por réplica. La producción de huevos debe registrarse como el número de huevos/hembra superviviente/día por réplica. Los huevos se eliminan a diario de los recipientes de ensayo. Para el pez cabeza gorda y el pez cebra, deben colocarse sustratos de desove en el recipiente de ensayo para permitir que los peces desoven en condiciones normales. En el apéndice 4 se recoge más información sobre los sustratos de desove recomendados para el pez cebra (apéndice 4A) y el pez cabeza gorda (apéndice 4B). No es necesario proporcionar sustrato de desove para el medaka.

*Sacrificio compasivo de los peces*

41. El vigesimoprimer día, es decir, al final de la exposición, los peces deben ser sacrificados con unas cantidades adecuadas de tricaína [metanosulfonato de tricaína, metacaína, MS-222 (CAS 886-86-2)], 100-500 mg/l, amortiguados con 300 mg/l de $NaHCO_3$ (bicarbonato sódico, CAS 144-55-8) para reducir la irritación de la membrana mucosa; a continuación se realiza un muestreo de sangre o tejido para determinar el nivel de VTG, tal y como se explica en la sección dedicada a la vitelogenina.

*Observación de los caracteres sexuales secundarios*

42. Algunos productos con actividad endocrina pueden inducir cambios en los caracteres sexuales secundarios especializados (número de tubérculos nupciales en el pez cabeza gorda macho o tubérculos papilares en el medaka macho). En particular, los productos con determinados mecanismos de acción pueden provocar la aparición anómala de caracteres sexuales secundarios en los animales del sexo opuesto. Por ejemplo, los agonistas de los receptores de andrógenos, como la trembolona, la metiltestosterona y la dihidrotestosterona, pueden provocar que el pez cabeza gorda hembra desarrolle tubérculos nupciales pronunciados o que el medaka hembra desarrolle tubérculos papilares (11, 20, 21). También se ha observado que los agonistas de los receptores de estrógenos pueden reducir el número de tubérculos nupciales y el tamaño de la almohadilla dorsal en los machos adultos de pez cabeza gorda (26, 27). Estas observaciones morfológicas macroscópicas

▼M7

pueden proporcionar información cualitativa y cuantitativa útil para los posibles requisitos futuros de ensayos en peces. El número y el tamaño de los tubérculos nupciales en el pez cabeza gorda y de los tubérculos papilares en el medaka pueden cuantificarse directamente o, de manera más práctica, en especímenes conservados. Los procedimientos recomendados para la evaluación de los caracteres sexuales secundarios en el pez cabeza gorda y en el medaka se pueden consultar en el apéndice 5A y el apéndice 5B, respectivamente.

*Vitelogenina (VTG)*

43. Se extrae sangre de la arteria o de la vena caudal con un túbulo capilar para microhematocrito heparinizado o mediante punción cardíaca con una jeringa. En función del tamaño de los peces, los volúmenes de sangre que se pueden extraer suelen oscilar entre los 5 y los 60 µl por individuo en el caso del pez cabeza gorda y entre los 5 y los 15 µl por individuo en el caso del pez cebra. El plasma se separa de la sangre mediante centrifugado y se guarda con inhibidores de la proteasa a -80 °C hasta que se analice para determinar la VTG. De manera alternativa, en el medaka se utilizará el hígado y en el pez cebra se puede usar el homogeneizado de cabeza/cola como tejido de origen para la determinación de la VTG (apéndice 6). La medición de la VTG debe basarse en un método ELISA homólogo validado con ayuda de anticuerpos homólogos y de un patrón de VTG homólogo. Se recomienda utilizar un método capaz de detectar niveles de VTG tan bajos como unos pocos ng/ml de plasma (o ng/mg de tejido), que es el nivel de base en los peces macho no expuestos.

44. El control de calidad del análisis de la VTG se realizará mediante patrones, blancos y, como mínimo, análisis duplicados. Para cada método ELISA debe realizarse una prueba del efecto de matriz (efecto de dilución de la muestra) para determinar el factor mínimo de dilución de la muestra. Cada placa ELISA utilizada en ensayos de VTG debe incluir las siguientes muestras de control de calidad: al menos 6 patrones de calibración que cubran la gama de concentraciones previstas de VTG y al menos un blanco de ensayo de fijación no específico (analizado por duplicado). La absorbancia de estos blancos debe ser inferior al 5 % de la absorbancia máxima del patrón de calibración. Se analizarán como mínimo dos partes alícuotas (duplicados de pocillos) de cada dilución de la muestra. Los duplicados de los pocillos que varíen en más del 20 % deben volver a analizarse.

45. El coeficiente de correlación ($R^2$) de las curvas de calibración debe ser superior a 0,99. Sin embargo, una elevada correlación no es suficiente para garantizar una predicción adecuada de la concentración en todas las gamas. Además de tener una correlación suficientemente alta para la curva de calibración, la concentración de cada patrón, calculada a partir de la curva de calibración, debe encontrarse entre el 70 y 120 % de su concentración nominal. Si las concentraciones nominales presentan la tendencia de apartarse de la línea de regresión de calibración (por ejemplo, a concentraciones bajas), es posible que sea necesario dividir la curva de calibración en rangos bajos y altos o utilizar un modelo no lineal para ajustar adecuadamente los datos de absorbancia. Si la curva se divide, ambos segmentos de línea deben tener un $R^2 > 0,99$.

46. El límite de detección (LOD) se define como la concentración más baja del patrón analítico, y el límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja del patrón analítico multiplicada por el factor de dilución más bajo.

47. Cada día que se realicen ensayos de VTG, se analizará una muestra de enriquecimiento preparada con un patrón de referencia interensayos (apéndice 7). La relación entre la concentración prevista y la concentración medida se indicará junto con los resultados de cada conjunto de ensayos que se hayan realizado ese día.

*Evaluación de la histopatología gonadal*

48. Las autoridades reguladoras pueden requerir la realización de un examen de la histopatología gonadal para estudiar el órgano objetivo en el eje HPG tras una exposición al producto. A este respecto, las gónadas se fijan con todo el cuerpo o se diseccionan. Cuando se requiera el examen de histopatología, en la evaluación de la actividad endocrina del producto problema se observarán

▼M7

las respuestas específicas de las gónadas relacionadas con aspectos endocrinos. Estas respuestas diagnósticas incluirán básicamente la presencia de ovotestículos, hiperplasia de células de Leydig; disminución de la formación del vitelo, aumento de espermatogonias e hiperplasia perifocular. Otras lesiones gonadales, como atresia de ovocitos, degeneración testicular y cambios de fase, pueden tener diversas causas. El documento de orientación sobre la histopatología gonadal de los peces especifica los procedimientos que se usarán en la disección, fijación, sección y evaluación histopatológica de las gónadas (22).

DATOS E INFORME

**Evaluación de las respuestas de los biomarcadores mediante el análisis de la varianza (ANOVA)**

49. Para identificar la posible actividad de un producto, se comparan las respuestas entre los grupos de tratamiento y los grupos testigo mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Cuando se usa un testigo del disolvente, debe realizarse una prueba estadística apropiada entre los testigos del agua de dilución y los del disolvente para cada parámetro. En OCDE, 2006c (28) pueden consultarse las directrices relativas a la gestión de los datos de los testigos del agua de dilución y los del disolvente en posteriores análisis estadísticos. Todos los datos relativos a las respuestas biológicas deben analizarse y comunicarse por separado respecto a cada sexo. Si las hipótesis necesarias relativas a los métodos paramétricos no se cumplen –distribución no normal (por ejemplo, prueba de Shapiro-Wilk) o varianza heterogénea (prueba de Bartlett o Levene)–, deberá estudiarse la posibilidad de transformar los datos para homogeneizar las varianzas antes de efectuar el ANOVA o bien llevar a cabo un ANOVA ponderado. En caso de relación dosis-respuesta no monótona puede utilizarse la prueba de Dunnett (paramétrica) sobre comparaciones de varios pares o un ajuste Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni (no paramétrico). Se pueden usar otras pruebas estadísticas (por ejemplo, la prueba de Jonckheere-Terpstra o la prueba de Williams) si la relación dosis-respuesta es aproximadamente monótona. En el apéndice 8 se incluye un diagrama de flujo estadístico como ayuda para la toma de decisiones en relación con la prueba estadística más adecuada. Asimismo, se puede obtener más información en el documento de la OCDE relativo a los enfoques actuales sobre el análisis estadístico de datos sobre ecotoxicidad (28).

**Preparación de informes sobre los resultados del ensayo**

50. Los datos del estudio deben incluir:

*Instalaciones de ensayo:*

— Personal responsable y sus tareas en el estudio.

— Cada laboratorio debe haber demostrado su competencia en el uso de una gama de productos representativos.

*Producto problema:*

— Caracterización del producto problema.

— Naturaleza física y propiedades fisicoquímicas pertinentes.

— Método y frecuencia de preparación de las concentraciones de ensayo.

— Información sobre la estabilidad y la biodegradabilidad.

*Disolvente:*

— Caracterización del disolvente (naturaleza, concentración utilizada).

— Justificación de la elección del disolvente (si fuera distinto al agua).

▼**M7**

*Animales de ensayo:*

— Especie y cepa.

— Proveedor e instalación específica del proveedor.

— Edad de los peces al comienzo del ensayo y estado reproductivo o de desove.

— Datos sobre el procedimiento de aclimatación de los animales.

— Peso corporal de los peces al principio de la exposición (a partir de una submuestra de la población de peces).

*Condiciones de ensayo:*

— Procedimiento de ensayo utilizado (tipo de prueba, tasa de carga, densidad de población, etc.).

— Método de preparación de las soluciones madre y caudal.

— Concentraciones nominales del ensayo, concentraciones medidas cada semana de las soluciones problema y método analítico utilizado, medias de los valores medidos y desviaciones típicas de los recipientes de ensayo, así como pruebas de que las mediciones corresponden a las concentraciones del producto problema en solución verdadera.

— Características del agua de dilución (incluidos el pH, la dureza, la alcalinidad, la temperatura, la concentración de oxígeno disuelto, los niveles residuales de cloro, el carbono orgánico total, los sólidos en suspensión y cualquier otra medición que se haya realizado).

— Calidad del agua en los recipientes de ensayo: pH, dureza, temperatura y concentración de oxígeno disuelto.

— Información detallada sobre la alimentación (por ejemplo, tipo de alimentos, origen, cantidad suministrada y frecuencia) y análisis de los contaminantes pertinentes, si estuvieran disponibles (por ejemplo, PCB, HAP y plaguicidas organoclorados).

*Resultados*

— Pruebas de que los testigos han cumplido los criterios de aceptación del ensayo.

— Datos sobre la mortalidad acaecida en cualquiera de las concentraciones y en los testigos del ensayo.

— Técnicas de análisis estadístico utilizadas, tratamiento de los datos y justificación de las técnicas utilizadas.

— Datos relativos a las observaciones biológicas de morfología macroscópica, incluidos los caracteres sexuales secundarios, la producción de huevos y la VTG.

— Resultados de los análisis de datos, preferentemente en formato tabular y gráfico.

— Incidencia de toda reacción anómala de los peces y de todo efecto visible producido por el producto problema.

▼M7

ORIENTACIÓN PARA LA INTERPRETACIÓN Y LA ACEPTACIÓN DE LOS RESULTADOS DEL ENSAYO

51. Esta sección contiene una serie de consideraciones que deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados del ensayo con respecto a los diversos parámetros medidos. Los resultados deben interpretarse con cautela cuando el producto problema parezca provocar una toxicidad manifiesta o afectar al estado general del animal de ensayo.

52. Al ajustar la gama de concentraciones del ensayo, se debe tener cuidado de no superar la concentración máxima tolerada, de forma que se pueda realizar una interpretación significativa de los datos. Es importante contar al menos con un tratamiento en el que no haya indicios de efectos tóxicos. Los signos de enfermedades y de efectos tóxicos deben evaluarse y registrarse exhaustivamente. Por ejemplo, es posible que la producción de VTG en las hembras también se vea afectada por la toxicidad general y mecanismos de acción tóxicos no endocrinos como, por ejemplo, hepatotoxicidad. No obstante, la interpretación de los efectos puede corroborarse con otros niveles de tratamiento que no se hayan visto afectados por la toxicidad sistémica.

53. Hay varios aspectos que deben tenerse en cuenta con respecto a la aceptación de los resultados del ensayo. Como pauta, los niveles de VTG en los grupos testigo de machos y hembras deben diferenciarse y estar separados aproximadamente por tres órdenes de magnitud en el pez cabeza gorda y en el pez cebra, y aproximadamente por un orden de magnitud en el medaka. En los informes de validación (1, 2, 3, 4) figuran ejemplos de la gama de valores obtenidos en los grupos testigo y de tratamiento. Unos valores altos de VTG en los machos testigo podrían comprometer la capacidad de respuesta del ensayo y su capacidad para detectar agonistas débiles de estrógenos. Unos valores bajos de VTG en las hembras testigo podrían comprometer la capacidad de respuesta del ensayo y su capacidad para detectar inhibidores de la aromatasa y antagonistas de los estrógenos. Para elaborar esta orientación se utilizaron los estudios de validación.

54. La cuantificación de la producción de huevos está sujeta a importantes variaciones [el coeficiente de variación (CV) puede variar del 20 al 60 %] que afectan a la idoneidad del ensayo para detectar una disminución significativa de la producción de huevos inferior al 70 % cuando el CV se acerca al 50 % o más. Cuando el CV queda reducido a valores inferiores (alrededor del 20-30 %), el ensayo tendrá una potencia aceptable (80 %) para detectar una disminución del 40-50 % en la producción de huevos. El diseño del ensayo empleado para el pez cabeza gorda, que incluye cuatro réplicas por nivel de tratamiento, debe permitir una mayor potencia en el parámetro de fecundidad que un diseño de ensayo con solo dos réplicas.

55. Si un laboratorio no hubiera realizado el ensayo antes o si se hubieran producido cambios importantes (por ejemplo, cambio de cepa o del proveedor de los peces), se aconseja realizar un estudio de competencia técnica. Se recomienda utilizar productos que abarquen una variedad de mecanismos de acción o de impactos en varios parámetros del ensayo. En la práctica, se insta a cada laboratorio a recopilar sus propios datos de testigos históricos relativos a los machos y a las hembras, así como a realizar testigos positivos con un producto con actividad estrogénica (por ejemplo, el 17β-estradiol a 100 ng/l o un agonista débil conocido) que se traduzca en un aumento de la VTG en los peces macho, con un producto inhibidor de la aromatasa (por ejemplo, fadrozol o procloraz a 300 μg/l) que dé como resultado una reducción de la VTG en los peces hembra, y con un producto con actividad androgénica (por ejemplo, 17β-trembolona a 5 μg/l) que produzca la inducción de caracteres sexuales secundarios en las hembras del pez cabeza gorda y del medaka. Todos estos datos pueden compararse con los datos disponibles de los estudios de validación (1, 2, 3) para garantizar la competencia de los laboratorios.

56. En general, las mediciones de VTG deben considerarse positivas si se produce un aumento estadísticamente significativo de la VTG en los machos ($p < 0,05$) o una disminución estadísticamente significativa en las hembras ($p < 0,05$), como mínimo en la dosis máxima del ensayo en comparación con el grupo testigo y en ausencia de signos de toxicidad general. Un resultado positivo también se verá respaldado por la demostración de una relación biológicamente plausible entre la dosis y la curva de respuesta. Como se

▼M7

ha mencionado anteriormente, es posible que la disminución de la VTG no sea completamente por causas endocrinas. Sin embargo, un resultado positivo, por lo general, se debe interpretar como prueba de actividad endocrina *in vivo* y, normalmente, debe conllevar acciones para obtener más aclaraciones.

57. Las autoridades reguladoras podrán requerir una evaluación de la histopatología gonadal para determinar la capacidad reproductora de los animales de ensayo y permitir evaluar los resultados del ensayo mediante una ponderación de las pruebas. Los resultados de la histopatología gonadal pueden no ser necesarios en casos en los que el análisis de la VTG o los caracteres sexuales secundarios sean positivos (es decir, haya un aumento o disminución de la VTG o una inducción de caracteres sexuales secundarios).

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2006a). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1A). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.60, Paris.

(2) OCDE (2006b). Report of the Initial Work Towards the Validation of the 21-Day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine active Substances (Phase 1 B). OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.61, Paris.

(3) OCDE (2007). Final report of the Validation of the 21-day Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances. Phase 2: Testing Negative Substances. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.78, Paris.

(4) Owens JW (2007). Phase 3 report of the validation of the OECD Fish Screening Assay. CEFIC LRI Project, Endocrine. http://www.cefic-lri.org/index.php?page=projects (accessed 18/09/08).

(5) US EPA (2007). Validation of the Fish Short-Term Reproduction Assay: Integrated Summary Report. 15 December 2007. US Environmental Protection Agency, Washington, DC. 104 pp.

(6) OCDE (2008). Report of the Validation Peer Review for the 21-Day Fish Endocrine Screening Assay and Agreement of the Working Group of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme on the Follow-up of this Report. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.94, Paris.

(7) Sumpter J.P. and S. Jobling (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environmental Health Perspectives; 103 Suppl 7:173-8 Review.

(8) Pawlowski S., *et al.* (2004). Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17alpha-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. Aquatic Toxicology; 68(3):277-91.

(9) Andersen L., *et al* (2006). Short-term exposure to low concentrations of the synthetic androgen methyltestosterone affects vitellogenin and steroid levels in adult male zebrafish (Danio rerio). Aquatic Toxicology; 76(3-4):343-52.

(10) Ankley G.T., *et al.* (2002). Evaluation of the aromatase inhibitor fadrozole in a short-term reproduction assay with the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Toxicological Sciences; 67(1):121-30.

▼M7

(11) Panter G.H., *et al.* (2004). Successful detection of (anti-)androgenic and aromatase inhibitors in pre-spawning adult fathead minnows (*Pimephales promelas*) using easily measured endpoints of sexual development. Aquatic Toxicology; 70(1):11-21.

(12) Parks L.G., *et al.* (1999). Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterization and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 123(2):113-25.

(13) Panter G.H., *et al.* (1999). Application of an ELISA to quantify vitellogenin concentrations in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to endocrine disrupting chemicals. CEFIC-EMSG research report reference AQ001. CEFIC, Brussels, Belgium.

(14) Fenske M., *et al.* (2001). Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton- Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. Comp. Biochem. Phys. C 129 (3): 217-232.

(15) Holbech H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). Comparative Biochemistry and Physiology. Part C Pharmacology, toxicology and endocrinology; 130: 119-131

(16) Rose J., *et al.* (2002). Vitellogenin induction by 17b-estradiol and 17a-ethinylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). Comp. Biochem. Physiol. C 131: 531-539.

(17) Brion F., *et al.* (2002). Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure vitellogenin in the zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Toxicology and Chemistry; vol 21: 1699-1708.

(18) Yokota H., *et al.* (2001). Development of an ELISA for determination of the hepatic vitellogenin in Medaka (*Oryzias latipes*). *Jpn J Environ Toxicol* 4:87–98.

(19) Tatarazako N., *et al.* (2004). Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the Medaka. *Journal of Health Science* 50:301-308.

(20) Ankley G.T., *et al.* (2003). Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. Environmental Toxicology and Chemistry; 22(6): 1350-60.

(21) Seki M, *et al* (2004). Fish full life-cycle testing for androgen methyltestosterone on medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry; 23(3):774-81.

(22) OCDE (2010). Guidance Document on Fish Gonadal Histopathology. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 123, Paris.

(23) OCDE (2000) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris

(24) Hutchinson T.H., *et al.* (2006a). Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Review. Aquatic Toxicology, 76; pp.69–92.

(25) Hutchinson T.H., *et al.* (2006b). Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as «signposts,» not «traffic lights,» in risk assessment. Environmental Health Perspectives; 114 Suppl 1:106-14.

▼**M7**

(26) Miles-Richardson S.R., *et al*. (1999). Effects of waterborne exposure to 17β-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Aquat. Toxicol. 47, 129-145.

(27) Martinovic D., *et al*. (2008). Characterization of reproductive toxicity of vinclozolin in the fathead minnow and co-treatment with an androgen to confirm an anti-androgenic mode of action. Environ. Toxicol. Chem. 27, 478-488.

(28) OCDE (2006c), Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.54, OECD, Paris.

(29) US EPA (2008), Peer-Review Results for the Fish Short-Term Reproduction Assay, dated 30 January 2008, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 110 pp.

(30) OCDE (2012), *OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters*, OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 150, OECD, Paris.

▼**M7**

*Apéndice 1*

ABREVIATURAS Y DEFINICIONES

**Producto**: sustancia o mezcla.

**CV**: coeficiente de variación.

**ELISA**: enzimoinmunoanálisis de adsorción.

**Eje HPG**: eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

**Tasa de carga**: peso húmedo de peces por unidad de volumen de agua.

**MTC**: concentración máxima tolerada, que constituye aproximadamente el 10 % de la $LC_{50}$.

**Densidad de población**: número de peces por unidad de volumen de agua.

**Producto problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**VTG (vitelogenina)**: fosfolipoglucoproteína precursora de la proteína de la yema de huevo que normalmente se produce en las hembras sexualmente activas de todas las especies ovíparas.

▼M7

*Apéndice 2*

**CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EL ENSAYO DE CRIBADO ENDOCRINO DE PECES**

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. Especies recomendadas | Pez cabeza gorda (*Pimephales romelas*) | Medaka (*Oryzias latipes*) | Pez cebra (*Danio rerio*) |
| 2. Tipo de prueba | Dinámico | Dinámico | Dinámico |
| 3. Temperatura del agua | 25 ± 2 °C | 25 ± 2 °C | 26 ± 2 °C |
| 4. Calidad de la iluminación | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) | Bombillas fluorescentes (amplio espectro) |
| 5. Intensidad luminosa: | 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) | 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) | 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 000 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio) |
| 6. Fotoperiodo (las transiciones del amanecer o del anochecer son opcionales; sin embargo, no se han considerado necesarias) | 16 h de luz, 8 h de oscuridad | 12-16 h de luz, 12-8 h de oscuridad | 12-16 h de luz, 12-8 h de oscuridad |
| 7. Tasa de carga: | < 5 g por l | < 5 g por l | < 5 g por l |
| 8. Tamaño del recipiente de ensayo | 10 l (mínimo) | 2 l (mínimo) | 5 l (mínimo) |
| 9. Volumen de solución de ensayo | 8 l (mínimo) | 1,5 l (mínimo) | 4 l (mínimo) |
| 10. Sustituciones del volumen de las soluciones problema | 6 diarias como mínimo | 5 diarias como mínimo | 5 diarias como mínimo |
| 11. Edad de los organismos de ensayo | Véase el punto 21. | Véase el punto 21. | Véase el punto 21. |
| 12. Peso húmedo aproximado del pez adulto (g) | Hembras: 1,5 ± 20 %<br>Machos: 2,5 ± 20 % | Hembras: 0,35 ± 20 %<br>Machos: 0,35 ± 20 % | Hembras: 0,65 ± 20 %<br>Machos: 0,4 ± 20 % |
| 13. Número de peces por recipiente de ensayo | 6 (2 machos y 4 hembras) | 6 (3 machos y 3 hembras) | 10 (5 machos y 5 hembras) |
| 14. Número de tratamientos | = 3 (más los testigos correspondientes) | = 3 (más los testigos correspondientes) | = 3 (más los testigos correspondientes) |
| 15. Número de recipientes por tratamiento | 4 como mínimo | 4 como mínimo | 2 como mínimo |
| 16. Número de peces por concentración de ensayo | 16 hembras adultas y 8 machos (4 hembras y 2 machos en cada recipiente en paralelo) | 12 hembras adultas y 12 machos (3 hembras y 3 machos en cada recipiente en paralelo) | 10 hembras adultas y 10 machos (5 hembras y 5 machos en cada recipiente en paralelo) |
| 17. Régimen de alimentación | Adultos o nauplios vivos o congelados de artemia salina dos o tres veces al día (*ad libitum*), alimentos disponibles comercialmente o una combinación de las opciones mencionadas | Nauplios de artemia salina dos o tres veces al día (*ad libitum*), alimentos disponibles comercialmente o una combinación de las opciones mencionadas | Nauplios de artemia salina dos o tres veces al día (*ad libitum*), alimentos disponibles comercialmente o una combinación de las opciones mencionadas |

▼M7

| | | | |
|---|---|---|---|
| 18. Aireación | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior al 60 % de la saturación del aire | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior al 60 % de la saturación del aire | Ninguna, a menos que la concentración de OD sea inferior al 60 % de la saturación del aire |
| 19. Agua de dilución | Agua limpia superficial, de pozo o reconstituida, o agua corriente desclorada | Agua limpia superficial, de pozo o reconstituida, o agua corriente desclorada | Agua limpia superficial, de pozo o reconstituida, o agua corriente desclorada |
| 20. Periodo de preexposición | Se recomiendan 7-14 días | Se recomiendan 7-14 días | Se recomiendan 7-14 días |
| 21. Duración de la exposición al producto | 21 días | 21 días | 21 días |
| 22. Parámetros biológicos | — Supervivencia<br>— Comportamiento<br>— Fecundidad<br>— Caracteres sexuales secundarios<br>— VTG<br>— Histopatología gonadal opcional | — Supervivencia<br>— Comportamiento<br>— Fecundidad<br>— Caracteres sexuales secundarios<br>— VTG<br>— Histopatología gonadal opcional | — Supervivencia<br>— Comportamiento<br>— Fecundidad<br>— VTG<br>— Histopatología gonadal opcional |
| 23. Aceptabilidad del ensayo | Oxígeno disuelto ≥ 60 % de saturación; temperatura media de 25 ± 2 °C; 90 % de supervivencia de los peces en los testigos; concentraciones medidas del ensayo dentro del 20 % de las medias medidas por nivel de tratamiento. | Oxígeno disuelto ≥ 60 % de saturación; temperatura media de 25 ± 2 °C; 90 % de supervivencia de los peces en los testigos; concentraciones medidas del ensayo dentro del 20 % de las medias medidas por nivel de tratamiento. | Oxígeno disuelto ≥ 60 % de saturación; temperatura media de 26 ± 2 °C; 90 % de supervivencia de los peces en los testigos; concentraciones medidas del ensayo dentro del 20 % de las medias medidas por nivel de tratamiento. |

▼**M7**

*Apéndice 3*

**CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE UN AGUA DE DILUCIÓN ADECUADA**

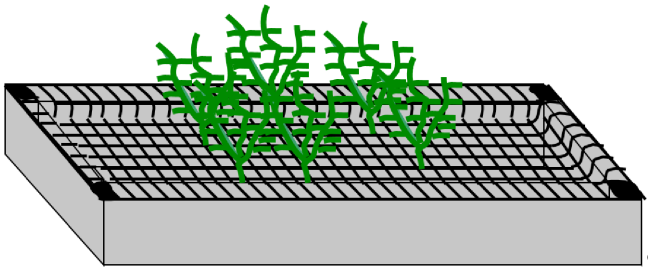
| COMPONENTE | CONCENTRACIONES |
|---|---|
| Partículas | < 20 mg/l |
| Carbono orgánico total | < 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | < 1 µg/l |
| Cloro residual | < 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | < 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | < 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | < 25 ng/l |

▼M7

*Apéndice 4A*

**SUSTRATO DE DESOVE PARA EL PEZ CEBRA**

**Bandeja de desove**: placa de instrumentos de vidrio, por ejemplo, 22 x 15 x 5,5 cm (largo x ancho x fondo), cubierta con una rejilla de alambre de acero inoxidable extraíble (2 mm de abertura de malla). La rejilla debe cubrir la placa de instrumentos por debajo del nivel del borde.



El sustrato de desove debe estar fijado a la rejilla; debe proporcionar una estructura en la que los peces puedan introducirse. Por ejemplo, son adecuadas las plantas artificiales de acuario hechas de material plástico de color verde (Nota: Debe tenerse en cuenta la posible adsorción del producto problema al material de plástico). El material de plástico debe lixiviarse en un volumen suficiente de agua caliente durante un tiempo para garantizar que no pasan productos al agua del ensayo. Cuando se utilicen materiales de vidrio, hay que asegurarse de que los peces no puedan resultar heridos ni quedar hacinados durante sus acciones vigorosas.

La distancia entre la bandeja y los paneles de vidrio debe ser de 3 cm como mínimo para garantizar que el desove no se realice fuera de la bandeja. Los huevos desovados en la bandeja caen a través de la rejilla y se puede recoger una muestra entre 45 y 60 minutos después de activar la iluminación. Los huevos transparentes no se adhieren y se pueden contar fácilmente con luz transversal. Cuando se utilicen cinco hembras por recipiente, una cantidad de hasta veinte huevos diarios puede considerarse una cifra baja, una cantidad de hasta 100 huevos se considera una cifra intermedia y una cantidad superior a 100 se considera una cifra alta. La bandeja de desove se retira para recoger los huevos, y se vuelve a introducir en el recipiente de ensayo, lo más tarde posible por la tarde o muy temprano por la mañana. El tiempo transcurrido hasta la reintroducción no debe superar una hora ya que, de lo contrario, la señal del sustrato de desove puede inducir algún apareamiento y desove a una hora poco habitual. Si la situación requiriera una introducción posterior de la bandeja de desove, debería hacerse al menos nueve horas después de activar la iluminación. A esta última hora del día ya no se induce el desove.

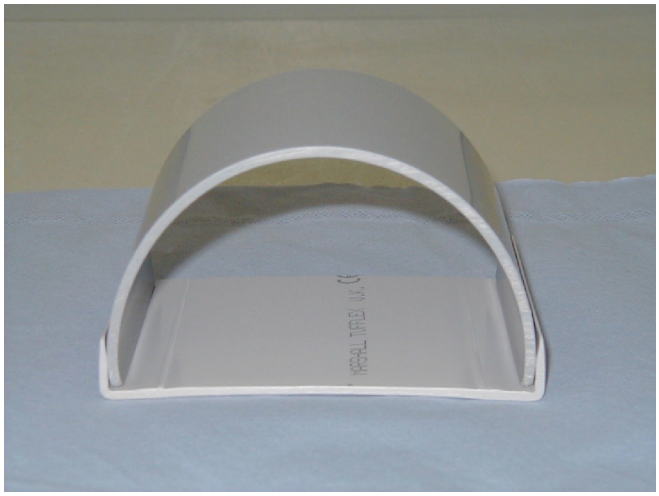
▼M7

*Apéndice 4B*

**SUSTRATO DE DESOVE DEL PEZ CABEZA GORDA**

En cada recipiente de ensayo se colocan dos o tres tejas y bandejas de desove combinadas de plástico/cerámica/vidrio o de acero inoxidable (por ejemplo, un canalón semicircular gris de 80 mm de largo colocado sobre una bandeja con borde de 130 mm de largo) (véase la imagen). Ha quedado demostrado que las tejas de PVC o cerámica bien preparadas resultan adecuadas como sustrato de desove (Thorpe *et al.*, 2007).

Se recomienda someter a abrasión las tejas para mejorar la adherencia. La bandeja también debe protegerse para evitar que los peces accedan a los huevos que hayan caído, a menos que haya quedado demostrada la eficiencia de la adherencia de los huevos en el sustrato de desove utilizado.



La base se diseña para contener los huevos que no se adhieran a la superficie de la teja y que, por lo tanto, caigan al fondo del recipiente (o los huevos que directamente se coloquen en la base de plástico plana). Todos los sustratos de desove deben lixiviarse durante 12 horas como mínimo, con agua de dilución, antes de usarse.

Thorpe KL, Benstead R, Hutchinson TH, Tyler CR, 2007. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas.* Aquatic Toxicology, 81, 90–98.

▼M7

*Apéndice 5A*

## EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES SEXUALES SECUNDARIOS EN EL PEZ CABEZA GORDA PARA LA DETECCIÓN DE DETERMINADOS PRODUCTOS CON ACTIVIDAD ENDOCRINA

### Introducción

Entre las características potencialmente importantes del aspecto físico de los peces cabeza gorda adultos en los ensayos sobre alteradores endocrinos se incluyen el color del cuerpo (es decir, claro u oscuro), los modelos de coloración (es decir, la presencia o ausencia de franjas verticales), la forma del cuerpo (es decir, forma de la zona de la cabeza y del pecho, distensión del abdomen) y caracteres sexuales secundarios específicos (es decir, número y tamaño de tubérculos nupciales, tamaño de la almohadilla dorsal y ovipositor).

Los tubérculos nupciales se encuentran en la cabeza (almohadilla dorsal) de los peces cabeza gorda machos con actividad reproductora y, habitualmente, están dispuestos siguiendo un modelo simétrico bilateral (Jensen *et al.* 2001). Las hembras testigo y los machos y hembras juveniles no presentan desarrollo de tubérculos (Jensen *et al.* 2001). Puede haber hasta ocho tubérculos distintos alrededor de los ojos y entre las narinas de los machos. Los tubérculos más abundantes y de mayor tamaño se encuentran en dos líneas paralelas que aparecen justo debajo de las narinas y encima de la boca. Muchos peces tienen grupos de tubérculos debajo de la mandíbula inferior. Los que más cerca están de la boca aparecen, en general, en forma de par simple, mientras que los de posición más ventral pueden estar formados hasta por cuatro tubérculos. El número real de tubérculos rara vez supera los 30 (rango, 18-28; Jensen *et al*. 2001). Los tubérculos predominantes (en términos de número) aparecen como una estructura individual y relativamente redonda, con una altura que equivale aproximadamente al radio. Los machos con mayor actividad reproductora también tienen, al menos algunos, tubérculos que engrosan y protruyen de forma que no pueden diferenciarse como estructuras individuales.

Algunos tipos de productos que alteran la actividad endocrina pueden provocar la aparición anómala de determinados caracteres sexuales secundarios en el sexo opuesto; por ejemplo, los agonistas de receptores de andrógenos, como la 17α-metiltestosterona o la 17β-trembolona, pueden provocar que los peces cabeza gorda hembra desarrollen tubérculos nupciales (Smith 1974; Ankley *et al.* 2001; 2003), mientras que los agonistas de receptores de estrógenos pueden reducir el número o el tamaño de los tubérculos nupciales en los machos (Miles-Richardson *et al*. 1999; Harries *et al*. 2000).

A continuación se presenta una descripción de la caracterización de los tubérculos nupciales en el pez cabeza gorda, con arreglo a los procedimientos utilizados en el laboratorio de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos, ubicado en Duluth, Minnesota. Algunos productos o equipos específicos se pueden sustituir por materiales comparables disponibles.

La mejor visualización se logra con una lupa iluminada o con un microscopio de disección iluminado 3X. Observe los peces en posición dorsal, con la parte anterior hacia delante (con la cabeza orientada hacia el observador).

— Coloque los peces en una placa de Petri pequeña (por ejemplo, de 100 mm de diámetro), con la parte anterior hacia delante y la ventral hacia abajo. Enfoque el visor para permitir la identificación de los tubérculos. Suave y lentamente, gire los peces de un lado a otro para identificar las zonas de los tubérculos. Cuente y clasifique los tubérculos.

— Repita esta observación en la superficie ventral de la cabeza colocando el pez sobre la cara dorsal, con la parte anterior hacia delante en la placa de Petri.

— Las observaciones deben llevarse a cabo en dos minutos con cada pez.

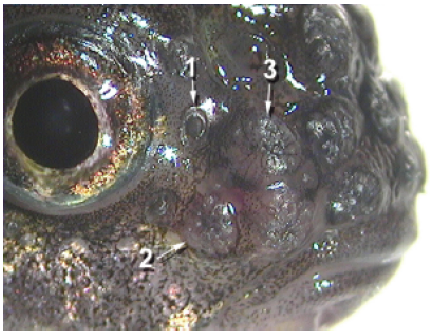
▼M7

**Recuento y clasificación de los tubérculos**

Se han determinado seis áreas concretas para evaluar la presencia y el desarrollo de tubérculos en peces cabeza gorda adultos. Se ha elaborado una plantilla para cartografiar la ubicación y la cantidad de los tubérculos presentes (véase el final de este apéndice). Se registra el número de tubérculos y su tamaño puede clasificarse cuantitativamente de la siguiente manera: 0: ausencia; 1: presente; 2: agrandado y 3: pronunciado, para cada organismo (véase la figura 1).

Tipo 0: ausencia de tubérculos. Tipo 1: presente, que se asigna cuando algún tubérculo tiene un solo punto cuya altura sea casi equivalente a su radio. Tipo 2: agrandado, que se asigna cuando hay tejido que se parece a un asterisco, habitualmente con una gran base radial con ranuras o surcos que salen del centro. La altura de los tubérculos suele ser más irregular, pero a veces pueden presentar una forma redondeada. Tipo 3: pronunciado; habitualmente son bastante grandes y redondeados con una estructura menos definida. En ocasiones, estos tubérculos se unen y forman una sola masa en torno a una sola área o una combinación de áreas (B, C y D, que se describen a continuación). El color y el diseño son similares a los del tipo 2, pero en ocasiones son bastante indiscriminados. Con este sistema, el resultado será, en general, una clasificación de tubérculos inferior a 50 en un macho testigo normal con un recuento de tubérculos de 18 a 20 (Jensen *et al.* 2001).

*Figura 1*




El número real de tubérculos en algunos peces puede ser superior al de los recuadros de la plantilla en un área de clasificación determinada. En tal caso, pueden marcarse otros números de clasificación a la derecha o a la izquierda del recuadro. Por lo tanto, no es necesario que la plantilla sea simétrica. Otra técnica para la cartografía de los tubérculos que se emparejan o unen verticalmente a lo largo del plano horizontal de la boca consiste en el doble marcado de dos puntos de clasificación de los tubérculos en un mismo recuadro.

**Regiones de cartografía:**

A — Tubérculos situados alrededor del ojo. Ubicación dorsal a ventral alrededor del borde anterior del ojo. Habitualmente múltiples en los machos testigo maduros, no presentes en las hembras testigo y, en general, en parejas (uno cerca de cada ojo) o aislados en las hembras expuestas a andrógenos.

B-Tubérculos situados entre las narinas (poros de los canales sensoriales). Normalmente, en parejas en los machos testigo a niveles más altos de desarrollo (2: agrandado o 3: pronunciado). No están presentes en las hembras testigo y presentan una cierta incidencia y desarrollo en las hembras expuestas a andrógenos.

C — Tubérculos situados en posición inmediatamente anterior a las narinas en paralelo con la boca. Generalmente agrandados o pronunciados en los machos testigo maduros. Presentes o agrandados en los machos menos desarrollados o en las hembras tratadas con andrógenos.

▼M7

D — Tubérculos situados en paralelo con la línea de la boca. En general, se clasifican como desarrollados en los machos testigo. Ausentes en las hembras testigo, pero presentes en las hembras expuestas a andrógenos.

E — Tubérculos situados en la mandíbula inferior, cerca de la boca, por lo general pequeños y habitualmente en parejas. Varían en los machos testigo o tratados y en las hembras tratadas.

F — Tubérculos situados en posición ventral con respecto a la región E. Habitualmente son pequeños y aparecen en parejas. Presentes en los machos testigo y en las hembras expuestas a andrógenos.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Korte JJ, Makynen ME. 2001. Description and evaluation of a short-term reproduction test with the fathead minnow (Pimephales promelas). *Environ Toxicol Chem* 20:1276-1290.

(2) Ankley GT, Jensen KM, Makynen EA, Kahl MD, Korte JJ, Hornung MW, Henry TR, Denny JS, Leino RL, Wilson VS, Cardon MC, Hartig PC, Gray EL. 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-β trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* 22:1350-1360.

(3) Harries JE, Runnalls T, Hill E, Harris CA, Maddix S, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of a reproductive performance test for endocrine disrupting chemicals using pair-breeding fathead minnows *(Pimephales promelas). Environ Sci Technol* 34:3003-3011.

(4) Jensen KM, Korte JJ, Kahl MD, Pasha MS, Ankley GT. 2001. Aspects of basic reproductive biology and endocrinology in the fathead minnow *(Pimephales promelas). Comp Biochem Physiol C* 128:127-141.

(5) Kahl MD, Jensen KM, Korte JJ, Ankley GT. 2001. Effects of handling on endocrinology and reproductive performance of the fathead minnow. *J Fish Biol* 59:515-523.

(6) Miles-Richardson SR, Kramer VJ, Fitzgerald SD, Render JA, Yamini B, Barbee SJ, Giesy JP. 1999. Effects of waterborne exposure of 17-estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows *(Pimephales promelas). Aquat Toxicol* 47:129-145.

(7) Smith RJF. 1974. Effects of 17α-methyltestosterone on the dorsal pad and tubercles of fathead minnows *(Pimephales promelas). Can J Zool* 52:1031-1038.

**Plantilla de tubérculos:**

**ID** _____

**Fecha** _____

**Puntuación total** _____

**Clasificación numérica**

1: presente

2: agrandado

3: pronunciado

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **A** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **B** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** |

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **C** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** |
| | **D** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | **E** | **X1** | **X1** | | |
| | **F** | **X1** | **X1** | **X1** | **X1** |

▼M7

*Apéndice 5B*

**EVALUACIÓN DE LOS CARACTERES SEXUALES SECUNDARIOS EN EL MEDAKA PARA LA DETECCIÓN DE DETERMINADOS PRODUCTOS CON ACTIVIDAD ENDOCRINA**

A continuación se presenta una descripción de la medición de los tubérculos papilares ([1]), que constituyen los caracteres sexuales secundarios del medaka (*Oryzias latipes*).

1) Tras la extirpación del hígado (apéndice 6), el cadáver se coloca en un tubo cónico que contiene aproximadamente 10 ml de formol tamponado neutro al 10 % (arriba la cabeza y abajo la cola). Si la gónada se fija con una solución distinta al formol tamponado neutro al 10 %, con una cuchilla realice un corte transversal en el cadáver entre la región anterior de la aleta anal y el ano, con cuidado de no dañar el gonoporo y la propia gónada (fig. 3). Coloque la parte craneal del cuerpo del pez en la solución de fijación para conservar la gónada y la parte caudal del cuerpo del pez en el formol tamponado neutro al 10 %, tal y como se ha descrito anteriormente.

2) Tras colocar el cuerpo del pez en formol tamponado neutro al 10 %, sujete la región anterior de la aleta anal con unas pinzas y dóblela durante unos 30 segundos para mantener abierta la aleta anal. Al sujetar la aleta anal con las pinzas, agarre varios radios de la aleta de la región anterior, con cuidado de no provocar arañazos en los tubérculos papilares.

3) Tras mantener abierta la aleta anal durante 30 segundos aproximadamente, conserve el cuerpo del pez en formol tamponado neutro al 10 % a temperatura ambiente hasta que se lleve a cabo la medición de los tubérculos papilares (la medición debe realizarse cuando se haya realizado la fijación durante como mínimo 24 horas).

Medición

1) Tras fijar el cuerpo del pez en formol tamponado neutro al 10 % durante 24 horas como mínimo, tome el cadáver del pez del tubo cónico y retire el formol con un papel de filtro (o una servilleta de papel).

2) Coloque el pez con el abdomen orientado hacia arriba. A continuación, corte con cuidado la aleta anal con unas tijeras pequeñas de disección (es preferible cortar la aleta anal con una pequeña cantidad de pterigióforo).

3) Tome con ayuda de unas pinzas la región anterior de la aleta anal cortada y colóquela en un portaobjetos de vidrio con unas cuantas gotas de agua. A continuación, cubra la aleta anal con un cubreobjetos de vidrio. Asegúrese de no provocar arañazos en los tubérculos papilares al agarrar la aleta anal con las pinzas.

4) Cuente el número de segmentos de los radios con tubérculos papilares con ayuda de un contador en un microscopio biológico (microscopio vertical o invertido). Los tubérculos papilares se reconocen cuando se puede ver una pequeña formación de tubérculos en el margen posterior del segmento. Anote en la hoja de cálculo el número de segmentos con tubérculos papilares en cada radio de la aleta (por ejemplo, primer radio de la aleta: 0; segundo radio

([1]) Los tubérculos papilares aparecen normalmente solo en los machos adultos y se encuentran en los radios de las aletas, del segundo al séptimo u octavo contando desde el extremo posterior de la aleta anal (fig. 1 y fig. 2). Sin embargo, en raras ocasiones aparecen tubérculos en el primer radio de la aleta, contando desde el extremo posterior de la aleta anal. Este procedimiento normalizado de trabajo (PNT) abarca la medición de los tubérculos en el primer radio de la aleta (en este PNT el número de radio de la aleta hace referencia al orden desde el extremo posterior de la aleta anal).

▼M7

de la aleta: 10; tercer radio de la aleta: 12, etc.), e introduzca en la hoja de cálculo de Excel la suma de estas cantidades para cada pez. En caso necesario, haga una fotografía de la aleta anal y cuente el número de segmentos con tubérculos papilares que aparecen en la fotografía.

5) Después de la medición, coloque la aleta anal en el tubo cónico que se describe en el punto 1 y consérvela.

*Fig. 1.*

**Diagrama que muestra las diferencias sexuales en la forma y el tamaño de la aleta anal. A, macho; B, hembra. Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.**

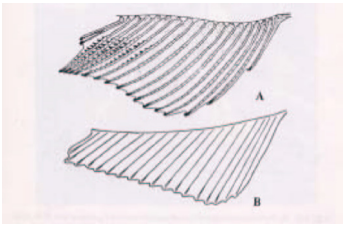



*Fig. 2.*

**A: Tubérculos en los segmentos del radio de la aleta anal. J.P., segmento; A.S., espacio axial; P., tubérculo. B: Extremo distal del radio de la aleta. En el extremo hay actinotricos (Act.). Oka, T. B., 1931. On the processes on the fin rays of the male of *Oryzias latipes* and other sex characters of this fish. J. Fac. Sci., Tokyo Univ., IV, 2: 209-218.**

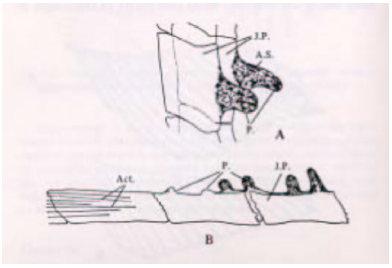
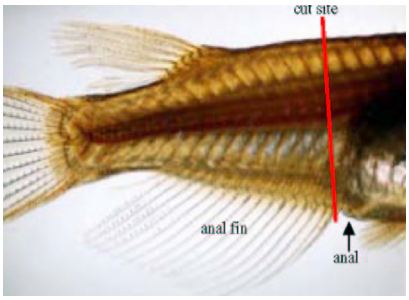



*Fig. 3.*

**Fotografía del cuerpo de un pez que muestra el lugar del corte cuando la gónada se fija con una solución de fijación distinta del formol tamponado neutro al 10 %. En ese caso, el resto del cuerpo se cortará entre la región anterior de la aleta anal y la región anal con una cuchilla (línea roja) y la parte de la cabeza del cuerpo del pez se introducirá en la solución de fijación para la gónada y la parte de la cola del cuerpo del pez se introducirá en el formol tamponado neutro al 10 %.**



▼M7

*Apéndice 6*

**PROCEDIMIENTOS RECOMENDADOS PARA LA RECOGIDA DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE VITELOGENINA**

Se debe tener cuidado para evitar la contaminación cruzada entre las muestras de VTG de machos y hembras.

**Procedimiento 1A: Pez cabeza gorda, extracción de sangre de la vena o la arteria caudal**

Tras anestesiar, el pedúnculo caudal se corta parcialmente con una hoja de bisturí y se extrae sangre de la vena o la arteria caudal con un tubo capilar para microhematocrito heparinizado. Una vez recogida la sangre, el plasma se aísla rápidamente mediante centrifugado durante tres minutos a 15 000 *g* (o, de manera alternativa, durante diez minutos a 15 000 *g* a 4 °C). Si se desea, se puede determinar el hematocrito porcentual después del centrifugado. A continuación, se retira la parte de plasma del tubo para microhematocrito y se conserva en un tubo de centrífuga con 0,13 unidades de aprotinina (inhibidor de la proteasa) a – 80 °C hasta que pueda determinarse la VTG. Según el tamaño del pez cabeza gorda (en función del sexo), los volúmenes de plasma que se pueden recoger oscilan, en general, entre 5 y 60 microlitros por pez (Jensen *et al*. 2001).

**Procedimiento 1 B: Pez cabeza gorda, extracción de sangre del corazón**

También se puede recoger sangre mediante punción cardíaca mediante una jeringa heparinizada (1 000 unidades de heparina por ml). La sangre se transfiere a tubos Eppendorf (que se mantienen en hielo) y, a continuación, se centrifugan (5 min, 7 000 *g*, a temperatura ambiente). El plasma debe transferirse a tubos Eppendorf limpios (en partes alícuotas si el volumen del plasma lo permite) y congelarse de inmediato a -80 °C hasta que se analice (Panter *et al.*, 1998).

**Procedimiento 2 A: Medaka, extirpación del hígado del medaka**

*Extracción de los peces del ensayo del recipiente de ensayo*

1) Los peces del ensayo deben extraerse del recipiente de ensayo con la red cuchara pequeña. Tenga cuidado de no dejar caer los peces del ensayo en otros recipientes.

2) En principio, los peces del ensayo deben extraerse en el orden siguiente: testigo, testigo del disolvente (si procede), concentración más baja, concentración media, concentración más alta y testigo positivo. Además, deben extraerse todos los machos de un recipiente de ensayo antes de extraer el resto de hembras.

3) El sexo de cada uno de los peces del ensayo se determina con arreglo a los caracteres sexuales secundarios externos (por ejemplo, la forma de la aleta anal).

4) Coloque los peces del ensayo en un recipiente de transporte y llévelo al puesto de trabajo para proceder a la extirpación del hígado. Verifique que las etiquetas del recipiente de ensayo y del recipiente de transporte sean correctas y para confirmar que el número de peces extraídos del recipiente de ensayo y el número de peces que quedan en dicho recipiente coincidan con los números previstos.

5) Si no se pudiera determinar el sexo mediante el aspecto externo de los peces, extraiga todos los peces del recipiente de ensayo. En ese caso, el sexo deberá determinarse mediante la observación de la gónada o de los caracteres sexuales secundarios con un microscopio estereoscópico.

*Extirpación del hígado*

1) Transfiera el pez del ensayo desde el recipiente de transporte a la solución anestésica con la red cuchara pequeña.

▼M7

2) Una vez anestesiado, transfiera el pez de ensayo al papel de filtro (o a la servilleta de papel) con unas pinzas (de tipo normal). Al agarrar el pez del ensayo, coloque las pinzas a los lados de la cabeza para evitar que se rompa la cola.

3) Retire el agua de la superficie del pez de ensayo con el papel de filtro (o la servilleta de papel).

4) Coloque el pez con el abdomen orientado hacia arriba. A continuación, realice una pequeña incisión transversal a medio camino entre la región ventral del cuello y la región media del abdomen con ayuda de unas tijeras de disección.

5) Introduzca las tijeras de disección en la pequeña incisión y realice una incisión en el abdomen desde un punto posterior a la cavidad branquial hasta la cara interior del ano y a lo largo de la línea media del abdomen. Tenga cuidado de no introducir las tijeras de disección a demasiada profundidad para evitar daños en el hígado y la gónada.

6) Realice las siguientes operaciones con un microscopio estereoscópico.

7) Coloque el pez del ensayo con el abdomen orientado hacia arriba sobre la servilleta de papel (también se pueden utilizar placas de Petri o portaobjetos de vidrio).

8) Extienda las paredes de la cavidad abdominal con unas pinzas de precisión hasta que se expongan los órganos internos. Si es necesario, también se pueden exponer los órganos internos retirando un lado de la pared de la cavidad abdominal.

9) Exponga la parte unida del hígado y de la vesícula biliar con otras pinzas de precisión. A continuación, sujete el conducto biliar y desprenda la vesícula con un corte. Tenga cuidado para no romper la vesícula.

10) Sujete el esófago y separe el tubo gastrointestinal del hígado de la misma manera. Tenga cuidado para que no se salga el contenido del tubo gastrointestinal. Separe el tubo gastrointestinal caudal del ano y extraiga el tubo de la cavidad abdominal.

11) Recorte la masa de grasa y otros tejidos del entorno del hígado. Tenga cuidado de no arañar el hígado.

12) Sujete el área del hilio hepático con las pinzas de precisión y extraiga el hígado de la cavidad abdominal.

13) Coloque el hígado en el portaobjetos de vidrio. Con ayuda de las pinzas de precisión, retire los eventuales restos de grasa y tejidos externos (por ejemplo, la mucosa abdominal) de la superficie del hígado, si fuera necesario.

14) Mida el peso del hígado con un microtubo de 1,5 ml como tara con una balanza analítica electrónica. Registre el valor en la hoja de cálculo (precisión de 0,1 mg). Confirme la información de identificación de la etiqueta del microtubo.

15) Cierre el tapón del microtubo que contiene el hígado. Guárdelo en una gradilla de refrigeración (o una gradilla con hielo).

16) Tras extirpar un hígado, limpie los instrumentos de disección o sustitúyalos por otros que estén limpios.

▼M7

17) Extirpe los hígados de todos los peces del recipiente de transporte, tal y como se ha descrito anteriormente.

18) Una vez que se haya extirpado el hígado de todos los peces del recipiente de transporte (es decir, todos los machos o las hembras de un recipiente de ensayo), coloque todas las muestras de hígado en una gradilla para tubos con una etiqueta de identificación y guárdelas en un congelador. Cuando los hígados se vayan a someter a un pretratamiento poco después de la extirpación, las muestras se llevan al puesto de trabajo más próximo en una gradilla de refrigeración (o una gradilla con hielo).

Tras la extirpación del hígado, el cadáver del pez puede utilizarse para la histología gonadal o para medir los caracteres sexuales secundarios.

***Muestra***

Guarde las muestras hepáticas recogidas de los peces del ensayo a ≤ – 70 °C si no van a utilizarse en un pretratamiento poco después de la extirpación.

*Fig. 1*

**Se realiza una incisión con unas tijeras justo en la zona anterior a las aletas pectorales.**

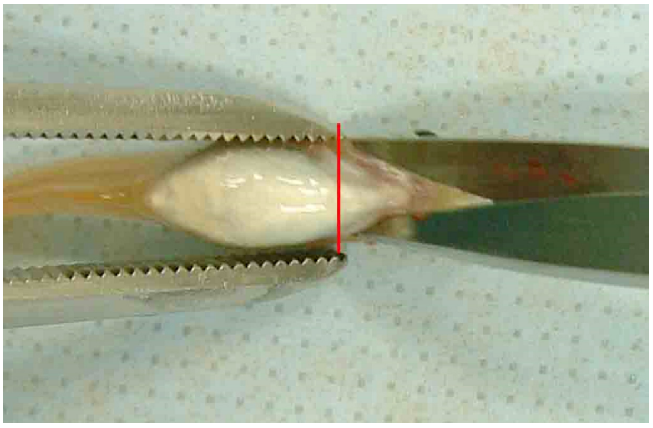
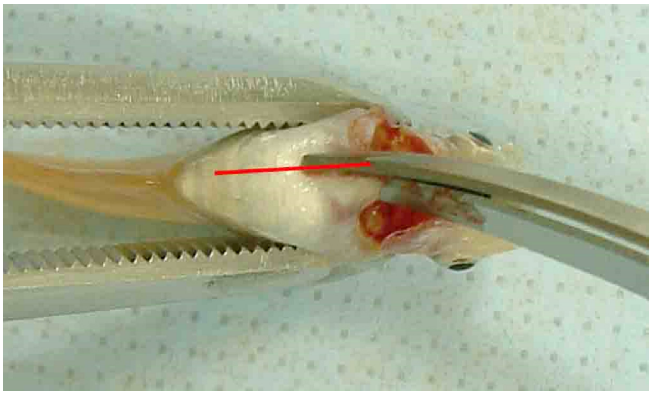


*Fig. 2*

**Se realiza una incisión en la línea media del abdomen con las tijeras hasta un punto aproximadamente 2 mm anterior al ano.**



▼M7

*Fig. 3*

**Las paredes abdominales se extienden con unas pinzas para exponer el hígado y otros órganos internos.**

(Otra posibilidad es sujetar lateralmente las paredes abdominales).

La flecha señala el hígado.

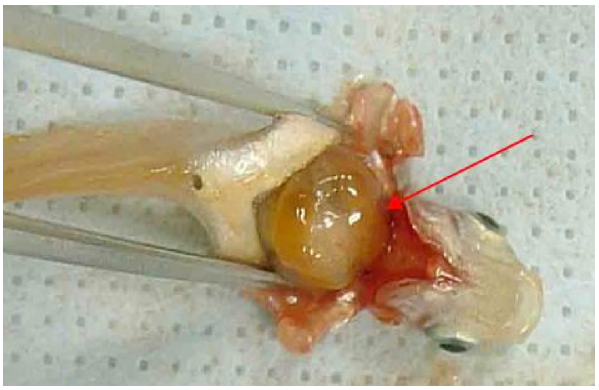


*Fig. 4*

**El hígado se somete a disección roma y se extirpa con pinzas.**

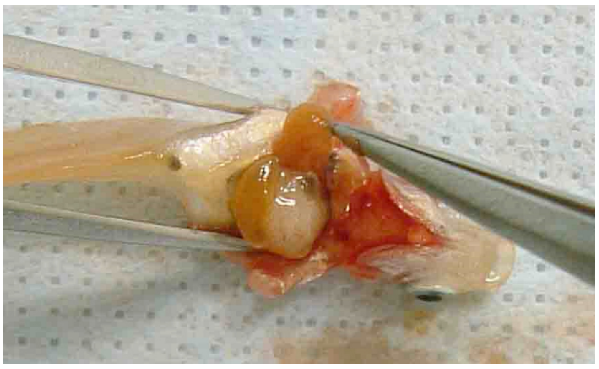
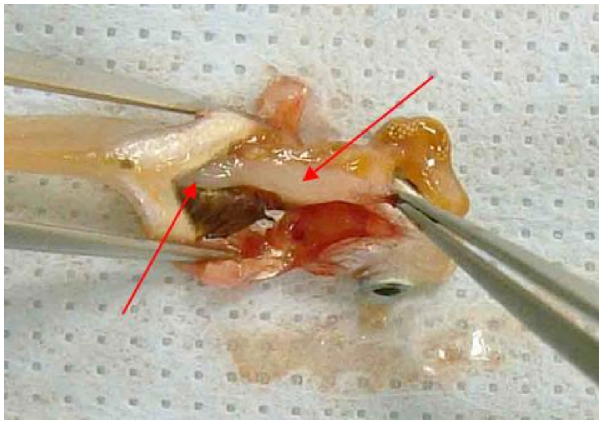


*Fig. 5*

**Se tira levemente con pinzas de los intestinos.**



▼M7

*Fig. 6*

**Los dos extremos de los intestinos y los eventuales elementos mesentéricos se cortan con unas tijeras.**

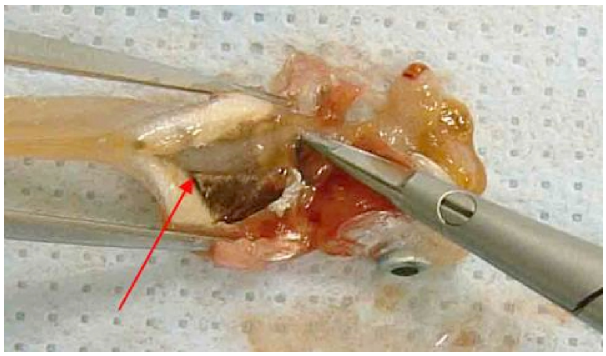


*Fig. 7 (hembra)*

**El procedimiento es idéntico con la hembra.**

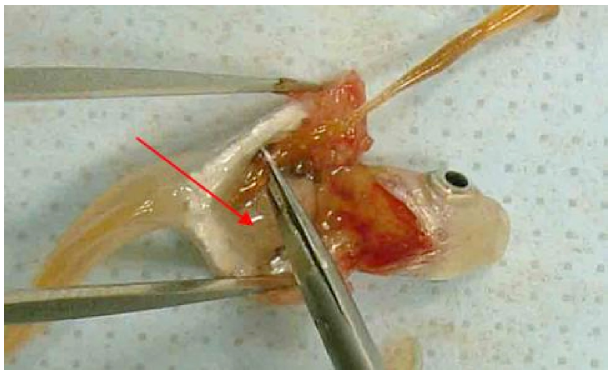
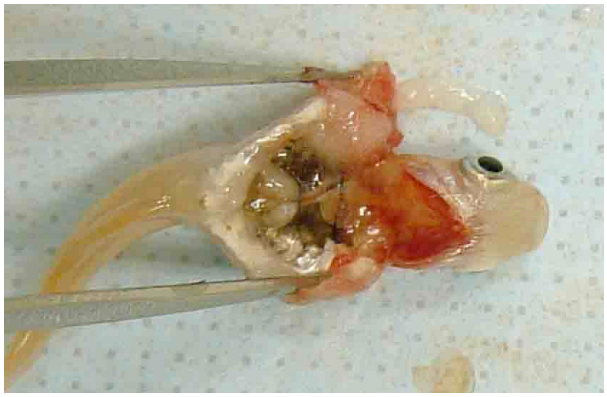


*Fig. 8*

**Una vez finalizado el procedimiento.**



▼M7

**Procedimiento 2 B: Pretratamiento del hígado del medaka (*Oryzias latipes*) para el análisis de la vitelogenina**

Tome el frasco de tampón de homogeneización del juego ELISA y enfríelo con hielo picado (temperatura de la solución: ≤ 4°C). Si se utiliza el tampón de homogeneización del sistema ELISA EnBio, descongele la solución a temperatura ambiente y, a continuación, enfríe el frasco con hielo picado.

Calcule el volumen del tampón de homogeneización para el hígado con arreglo a su peso (añada 50 µl de tampón de homogeneización por cada mg de peso del hígado). Por ejemplo, si el hígado pesa 4,5 mg, el volumen de tampón de homogeneización para el hígado será de 225 µl. Prepare una lista de volúmenes de tampón de homogeneización para todos los hígados.

*Preparación del hígado para el pretratamiento*

1) Justo antes del pretratamiento, saque del congelador el microtubo de 1,5 ml que contiene el hígado.

2) El pretratamiento del hígado de los machos debe realizarse antes que el de las hembras para evitar la contaminación con vitelogenina. Además, el pretratamiento de los grupos de ensayo debe realizarse en el orden siguiente: testigo, testigo del disolvente (si procede), concentración más baja, concentración media, concentración más alta y testigo positivo.

3) El número de microtubos de 1,5 ml que contienen muestras de hígado y que se extraen del congelador en un momento determinado no debe superar al número de microtubos que se puedan centrifugar en ese momento.

4) Disponga los microtubos de 1,5 ml con las muestras hepáticas siguiendo el orden del número de muestra de la gradilla con hielo (no es necesario descongelar el hígado).

*Realización del pretratamiento*

1) Adición del tampón de homogeneización

   Compruebe en la lista el volumen del tampón de homogeneización que debe utilizarse para una muestra concreta de hígado y ajuste la micropipeta (intervalo de volumen: 100 — 1 000 µl) al volumen correspondiente. Coloque una punta limpia en la micropipeta.

   Tome el tampón de homogeneización del frasco de reactivo y añada el tampón al microtubo de 1,5 ml que contiene el hígado.

   Añada el tampón de homogeneización a todos los microtubos de 1,5 ml que contienen el hígado siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. No es necesario cambiar la punta de la micropipeta por una nueva. No obstante, si la punta se contamina o se cree que puede estar contaminada, debe reemplazarse.

2) Homogeneización del hígado

   — Conecte una nueva mano de mortero de homogeneización al homogeneizador de microtubos.

   — Introduzca la mano de mortero en el microtubo de 1,5 ml. Sujete el homogeneizador de microtubos para comprimir el hígado entre la superficie de la mano de mortero y la pared interior del microtubo de 1,5 ml.

   — Ponga en marcha el homogeneizador de microtubos entre 10 y 20 segundos. Enfríe el microtubo de 1,5 ml con hielo picado durante la operación.

▼M7

— Levante la mano de mortero del microtubo de 1,5 ml y déjelo en reposo durante unos 10 segundos. A continuación, realice una comprobación visual del estado de la suspensión.

— Si se observan trozos de hígado en la suspensión, repita las operaciones 3 y 4 para preparar de forma satisfactoria el homogeneizado de hígado.

— Enfríe el homogeneizado de hígado suspendido en la gradilla con hielo hasta su centrifugado.

— Cambie la mano de mortero por una nueva para cada homogeneizado.

— Realice el homogeneizado de todos los hígados con el tampón de homogeneización de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

3) Centrifugado del homogeneizado de hígado suspendido

— Confirme que la temperatura de la cámara de centrifugado refrigerada es ≤ 5 °C.

— Inserte los microtubos de 1,5 ml que contienen el homogeneizado de hígado suspendido en una centrífuga refrigerada (en caso necesario, ajuste el equilibrio).

— Centrifugue el homogeneizado de hígado suspendido a 13 000 *g* durante 10 min a ≤ 5 °C. No obstante, si los sobrenadantes se separan correctamente, el tiempo y la fuerza centrífuga podrán ajustarse según resulte necesario.

— Tras el centrifugado, verifique que los sobrenadantes estén debidamente separados (superficie: lípidos; capa intermedia: sobrenadantes; capa inferior: tejido hepático). Si la separación no es correcta, centrifugue de nuevo la suspensión en las mismas condiciones.

— Retire todas las muestras de la centrífuga refrigerada y dispóngalas siguiendo el orden de número de muestra en la gradilla con hielo. Tenga cuidado de no volver a suspender cada capa separada después del centrifugado.

4) Recogida de los sobrenadantes

— Coloque cuatro microtubos de 0,5 ml para el almacenamiento del sobrenadante en la gradilla de tubos.

— Aspire 30 µl de cada sobrenadante (separado en forma de capa intermedia) con la micropipeta y páselos a un microtubo de 0,5 ml. Tenga cuidado de no aspirar los lípidos de la superficie ni el tejido hepático de la capa inferior.

— Aspire el sobrenadante y páselo a dos microtubos más de 0,5 ml de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

— Aspire el resto del sobrenadante con la micropipeta (si es posible: ≥ 100 µl). A continuación, pase el sobrenadante al microtubo de 0,5 ml restante. Tenga cuidado de no aspirar los lípidos de la superficie ni el tejido hepático de la capa inferior.

— Cierre el tapón del microtubo de 0,5 ml y anote el volumen de sobrenadante en la etiqueta. A continuación, enfríe inmediatamente los microtubos en la gradilla con hielo.

— Cambie la punta de la micropipeta por una nueva para cada sobrenadante. Si se adhiere a la punta una gran cantidad de lípidos, cámbiela inmediatamente por una nueva para evitar la contaminación del extracto de hígado con grasa.

▼M7

— Pase todo el sobrenadante centrifugado a cuatro microtubos de 0,5 ml de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

— Tras pasar el sobrenadante a los microtubos de 0,5 ml, colóquelos en la gradilla de tubos con su etiqueta de identificación y, a continuación, colóquelos inmediatamente en el congelador. Si las concentraciones de VTG se miden inmediatamente después del pretratamiento, mantenga refrigerado un microtubo de 0,5 ml (con 30 µl de sobrenadante) en la gradilla de tubos y transfiérala al puesto de trabajo en el que vaya a realizarse la prueba ELISA. En ese caso, coloque el resto de microtubos en las gradillas de tubos e introdúzcalas en el congelador.

— Tras recoger el sobrenadante, elimine el residuo de forma adecuada.

*Almacenamiento de la muestra*

Almacene los microtubos de 0,5 ml que contengan el sobrenadante del homogeneizado de hígado a ≤ – 70 °C hasta que se vayan a utilizar en la prueba ELISA.

**Procedimiento 3 A: Pez cebra, extracción de sangre de la vena o de la arteria caudal**

Tras anestesiar, el pedúnculo caudal se corta transversalmente y se extrae sangre de la arteria o de la vena caudal con un tubo capilar para microhematocrito heparinizado. El volumen de sangre varía entre 5 y 15 microlitros según el tamaño del pez. Se añade al tubo microcapilar un volumen igual de tampón de aprotinina (6 microgramos/ml en PBS) y el plasma se separa de la sangre por centrifugado (5 minutos a 600 *g*). El plasma se recoge en los tubos de ensayo y se conserva a -20 °C hasta que se analice para determinar la VTG u otras proteínas de interés.

**Procedimiento 3 B: Pez cebra, extracción de sangre por punción cardíaca**

Para evitar la coagulación de la sangre y el deterioro de la proteína, las muestras se recogen en un tampón con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene heparina (1 000 unidades/ml) y aprotinina inhibidora de la proteasa (2 TIU/ml). Se recomiendan la sal amónica de la heparina y la aprotinina liofilizada como ingredientes del tampón. Para la recogida de las muestras de sangre se recomienda usar una jeringa (1 ml) con una aguja fina fija (por ejemplo, Braun Omnikan-F). La jeringa debe llenarse previamente con el tampón (aproximadamente 100 microlitros) para eluir completamente los pequeños volúmenes de sangre de cada pez. Las muestras de sangre se toman mediante punción cardíaca. En un primer momento, el pez debe anestesiarse con MS-222 (100 mg/l). El plano anestésico adecuado permite al usuario distinguir el latido del pez cebra. Mientras puncione el corazón, mantenga una ligera presión en el pistón de la jeringa. Los volúmenes de sangre que pueden extraerse oscilan entre los 20 y los 40 microlitros. Tras la punción cardíaca, la mezcla de tampón y sangre debe pasarse al tubo de ensayo. El plasma se separa de la sangre por centrifugado (20 min; 5 000 *g*) y debe conservarse a – 80 °C hasta que se necesite para realizar el análisis.

**Procedimiento 3C: PNT: Pez cebra, homogeneización de la cabeza y la cola**

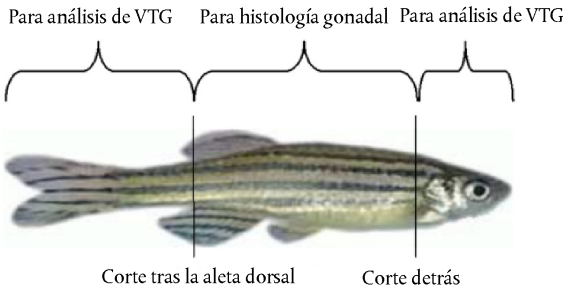
1. Los peces son anestesiados y sacrificados de conformidad con la descripción del ensayo.

2. La cabeza y la cola se separan del cuerpo mediante sendos cortes de acuerdo con la figura 1.

Importante: *Todos los instrumentos de disección y la tabla de corte deben enjuagarse y limpiarse a fondo (por ejemplo, con etanol al 96 %) entre cada uno de los peces para evitar que haya «contaminación con vitelogenina» de las hembras o entre los machos inducidos y los machos no inducidos.*

▼**M7**

*Figura 1*




3. El peso de la cabeza y la cola juntas de cada pez se mide con precisión de 1 mg.

4. Tras la pesada, las partes se colocan en tubos adecuados (por ejemplo, Eppendorf de 1,5 ml) y se congelan a -80 °C hasta que se realice la homogeneización o se homogeneizan directamente en hielo con dos manos de mortero de plástico. (Se pueden utilizar otros métodos si estos se llevan a cabo con hielo y el resultado es una masa homogénea). Importante: *Los tubos deben numerarse correctamente de modo que la cabeza y la cola de los peces puedan correlacionarse con la parte correspondiente del cuerpo que se utilice para la histología gonadal.*

5. Cuando se logra obtener una masa homogénea, se añade el **tampón de homogenización** ([1]) enfriado con hielo, con un peso que sea cuatro veces el peso del tejido. Siga trabajando con las manos de mortero hasta que la mezcla sea homogénea. Nota importante: *Se utilizan manos de mortero nuevas para cada pez.*

6. Las muestras se colocan en hielo hasta que se realiza el centrifugado a **4 °C** y a 50 000 *g* durante 30 minutos.

7. Utilice una pipeta para pasar porciones de 20 µl de sobrenadante **a dos tubos como mínimo**, sumergiendo la punta de la pipeta por debajo de la capa de grasa de la superficie y, con cuidado, succionando el sobrenadante sin partículas de grasa ni de precipitado.

8. Los tubos se conservan a -80 °C hasta que se utilicen.

([1]) Tampón de homogeneización:
— [Tris-HCl 50 mM pH 7,4; mezcla inhibidora de la proteasa al 1 % (Sigma)]: 12 ml de Tris-HCl pH 7,4 + 120 µl de mezcla inhibidora de la proteasa.
— TRIS: TRIS-ULTRA PURE (ICN); por ejemplo, de Bie & Berntsen, Dinamarca.
— Mezcla inhibidora de la proteasa: de Sigma (para tejidos de mamíferos), número de referencia P 8340.
*NOTA*: El tampón de homogeneización debe utilizarse el mismo día que se elabore. Colóquelo en hielo durante su uso.

▼M7

*Apéndice 7*

**MUESTRAS DE ENRIQUECIMIENTO DE VITELOGENINA Y PATRÓN DE REFERENCIA INTERENSAYOS**

Cada día que se realicen ensayos de VTG, se analizará una muestra de enriquecimiento preparada con un patrón de referencia interensayos. La VTG utilizada para realizar el patrón de referencia interensayos procederá de un lote distinto del usado para preparar los patrones de calibración del ensayo que se esté llevando a cabo.

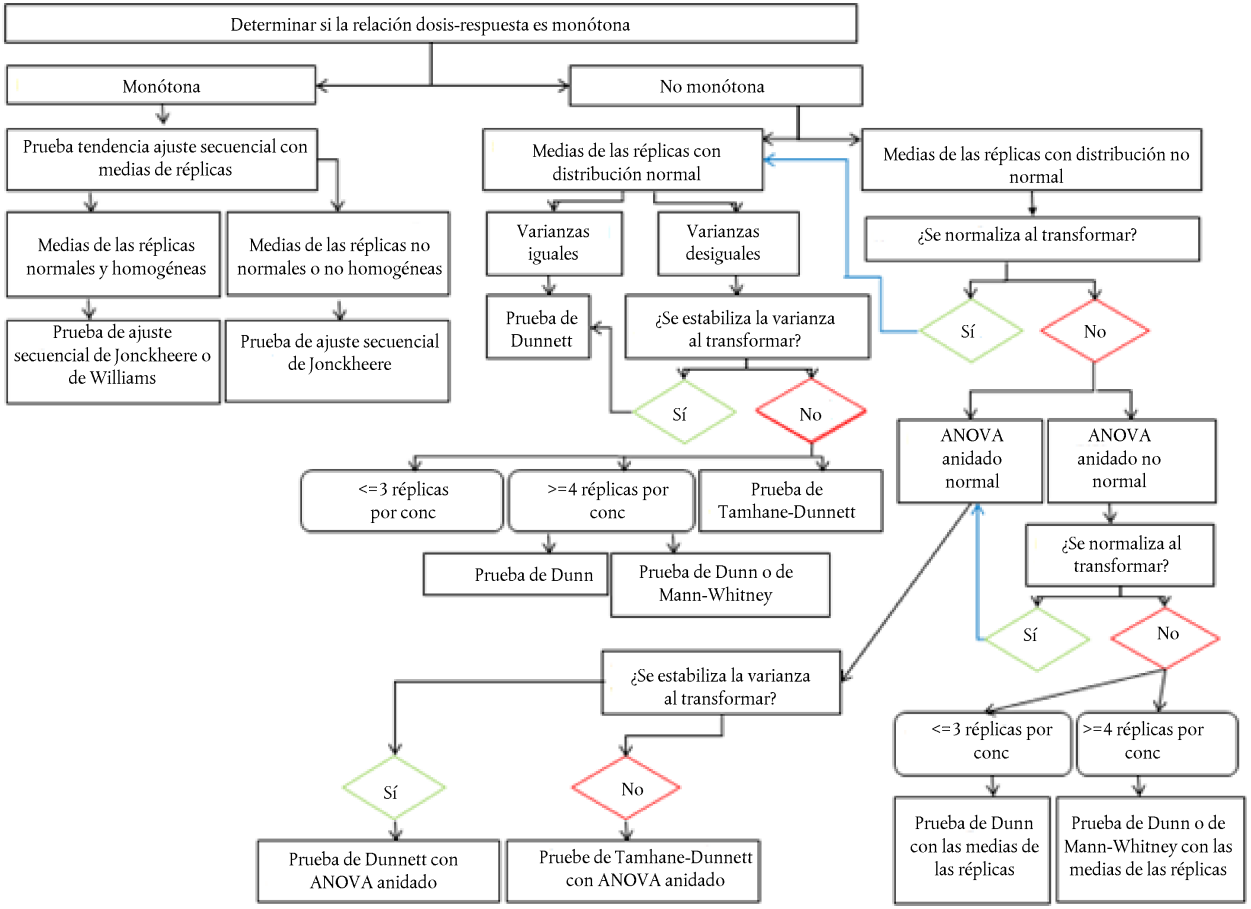
La muestra de enriquecimiento se elaborará añadiendo una cantidad conocida del patrón interensayos a una muestra de plasma de los machos testigo. La muestra se enriquecerá para lograr una concentración de VTG entre 10 y 100 veces la concentración de vitelogenina esperada en los peces macho testigo. La muestra de plasma de machos testigo que se enriquece puede provenir de un solo pez o puede ser una mezcla procedente de varios peces.

Se analizará una submuestra del plasma de los machos del testigo no enriquecido en, como mínimo, dos pocillos duplicados. La muestra enriquecida también se analizará en, como mínimo, dos pocillos duplicados. La cantidad media de vitelogenina de las dos muestras no enriquecidas de plasma de los machos testigo se añadirá a la cantidad calculada de VTG que se haya añadido para enriquecer las muestras a fin de determinar la concentración prevista. La relación entre esta concentración prevista y la concentración medida se indicará junto con los resultados de cada conjunto de ensayos que se haya realizado ese día.

▼M7

*Apéndice 8*

**DIAGRAMA DE FLUJO PARA TOMAR DECISIONES PARA EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO**



▼M7

## C.49. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA EN EMBRIONES DE PEZ (FET)

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo (ME) reproduce las directrices de ensayo (TG) 236 de la OCDE (2013). Describe el ensayo de toxicidad aguda en embriones de pez (FET) con el pez cebra (*Danio rerio*). Este ensayo está diseñado para determinar la toxicidad aguda de los productos en las fases embrionarias de los peces. El ensayo FET se basa en los estudios y actividades de validación llevados a cabo en el pez cebra (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14). Se ha aplicado satisfactoriamente a una amplia variedad de productos con diversos modos de acción y niveles de solubilidad, volatilidad e hidrofobicidad (véanse los puntos 15 y 16).

2. Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

3. Los huevos de pez cebra recién fecundados se exponen al producto problema durante un período de 96 horas. Cada 24 horas, se registran hasta cuatro observaciones principales empleadas como indicadores de letalidad (6): i) coagulación de los huevos fecundados, ii) ausencia de formación de somitas, iii) no desprendimiento de la cola del embrión del saco vitelino y iv) ausencia de latido cardíaco. Al final del período de exposición se determina la toxicidad aguda a partir de un resultado positivo en cualquiera de las cuatro observaciones principales registradas y se calcula la $LC_{50}$.

### CONSIDERACIONES INICIALES

4. Los siguientes datos ofrecen información útil sobre las propiedades específicas de la sustancia: fórmula estructural, peso molecular, pureza, estabilidad en el agua y a la luz, $pK_a$ y $K_{ow}$, hidrosolubilidad y presión de vapor, así como los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil [ME C.4 (17) o ME C.29 (18)]. La solubilidad y la presión de vapor pueden utilizarse para calcular la constante de la ley de Henry, que indicará si se producirán pérdidas debido a la evaporación de producto problema. Para determinar la cantidad de sustancia en las soluciones problema debe aplicarse un método analítico fiable, cuyo límite de detección y exactitud sean conocidos y figuren en el informe.

5. Si el método se utiliza para someter a ensayo una mezcla, deberá caracterizarse su composición en la medida de lo posible, mediante, por ejemplo, la identidad química de sus componentes, la cantidad en que están presentes y las propiedades específicas de cada sustancia (véase el punto 4). Antes de utilizar el método de ensayo con fines normativos en una mezcla hay que considerar si proporcionará resultados adecuados para la finalidad reglamentaria en cuestión.

6. En lo que respecta a las sustancias que pueden activarse mediante el metabolismo, existen pruebas de que en los embriones de pez cebra pueden darse procesos de biotransformación (19) (20) (21) (22). No obstante, la capacidad metabólica de los embriones de pez no siempre es equivalente a la de los peces juveniles o adultos. Por ejemplo, no se ha reconocido la toxicidad del protóxico alcohol alílico (9) en el presente FET. Por consiguiente, si hay cualquier indicación de que los metabolitos u otros productos de transformación relevantes pueden ser más tóxicos que el compuesto original, se recomienda realizar asimismo el ensayo con dichos metabolitos/productos de transformación y usar también estos resultados a la hora de concluir la toxicidad del producto problema; otra alternativa es llevar a cabo otro ensayo que tenga en cuenta mejor el metabolismo.

7. No se espera que los embriones sean sensibles a sustancias con una masa molecular mayor o igual que 3 kDa, una estructura molecular muy voluminosa y componentes que retrasen la eclosión, lo cual podría descartar o reducir la exposición tras la eclosión. Esta falta de sensibilidad se debe a la biodisponibilidad limitada de las sustancias y puede que otros ensayos de toxicidad resulten más apropiados.

▼M7

VALIDEZ DEL ENSAYO

8. Para que los resultados del ensayo sean válidos, deben cumplirse los criterios siguientes:

a) la tasa global de fecundación de todos los huevos recogidos deberá ser mayor o igual que el 70 % en el lote sometido a ensayo;

b) la temperatura del agua debe mantenerse a 26 ± 1 °C en los recipientes de ensayo durante toda la duración del ensayo;

c) la tasa global de supervivencia de los embriones en el testigo negativo (agua de dilución) y, si procede, en el testigo de disolvente deberá ser mayor o igual que el 90 % hasta el final del período de exposición de 96 horas;

d) la exposición al testigo positivo (p. ej., 4,0 mg/l de 3,4-dicloroanilina para el pez cebra) deberá dar como resultado una mortalidad mínima del 30 % al final del período de exposición de 96 horas;

e) la tasa de eclosión en el testigo negativo (y en el testigo de disolvente, si procede) deberá ser mayor o igual que el 80 % al final del período de exposición de 96 horas;

f) al final del período de exposición de 96 horas, la concentración de oxígeno disuelto en el testigo negativo y a la concentración de ensayo máxima deberá ser mayor o igual que el 80 % de la saturación.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

9. En el apéndice 2 se incluye un resumen de las condiciones de mantenimiento y de ensayo recomendadas.

**Equipo**

10. Se requiere el equipo siguiente:

a) Recipientes para los peces de material químicamente inerte (p. ej., vidrio) y con una capacidad adecuada a la carga recomendada (véase el punto 14, «Mantenimiento de los peces reproductores»);

b) microscopio invertido o binocular con una capacidad mínima de 80 aumentos; si la temperatura de la sala donde se registran las observaciones no se puede ajustar a 26 ± 1 °C, será necesario utilizar una platina que regule la temperatura con un mecanismo de movimiento cruzado u otro método para mantener la temperatura;

c) recipientes de ensayo, p. ej., placas estándar con 24 pocillos de una profundidad aproximada de 20 mm (véase el punto 11, «Recipientes de ensayo»);

d) hoja autoadhesiva, o similar, para cubrir las placas con 24 pocillos;

e) incubadora o sala con aire acondicionado de temperatura controlada, que permita mantener 26 ±1 °C en los pocillos (o en los recipientes de ensayo);

f) pHmetro;

g) medidor de oxígeno;

h) equipo para determinar la dureza y la conductividad del agua;

i) frasco de desove: bandejas de instrumentos de vidrio, acero inoxidable u otro material inerte; tela metálica (malla de 2 ± 0,5 mm) de acero inoxidable u otro material inerte para proteger los huevos puestos; sustrato de desove (p. ej., plantas artificiales de material inerte) [ME C.48, apéndice 4A (23)];

j) pipetas con aperturas amplias para recoger los huevos;

▼M7

k) recipientes de vidrio para preparar diferentes concentraciones de ensayo y agua de dilución (vasos, matraces graduados, probetas graduadas y pipetas graduadas) o para recoger los huevos de pez cebra (p. ej., vasos, placas de cristalización);

l) si se emplean otros sistemas de exposición, como un sistema dinámico (24) o de dosificación pasiva (25), para llevar a cabo el ensayo, se necesitarán las instalaciones y los materiales apropiados.

**Recipientes de ensayo**

11. Se deben usar recipientes de ensayo de vidrio o poliestireno (p. ej., placas con 24 pocillos de una capacidad de llenado de 2,5-5 ml por pocillo). Si se sospecha que hay adsorción al poliestireno (p. ej., para sustancias apolares, y planas con $K_{OW}$ elevado), deberán usarse materiales inertes (vidrio) para reducir las pérdidas por adsorción (26). Se deben colocar los recipientes al azar en la incubadora.

**Agua y condiciones del ensayo**

12. Se recomienda diluir el agua de mantenimiento con el fin de lograr niveles de dureza típicos de una amplia variedad de aguas superficiales. El agua de dilución debe prepararse a partir de agua reconstituida (27). El grado resultante de dureza debe ser equivalente a 100-300 mg/l de $CaCO_3$ con el objeto de evitar una precipitación excesiva de carbonato de calcio. Pueden utilizarse otras aguas de pozo o superficiales bien caracterizadas. El agua reconstituida puede adaptarse para obtener agua de mantenimiento de baja dureza mediante su dilución con agua desionizada a una razón de 1:5 como máximo para lograr una dureza mínima de 30-35 mg/l de $CaCO_3$. El agua se airea hasta la saturación del oxígeno antes de añadir el producto problema. Durante todo el ensayo, la temperatura en los pocillos debe mantenerse a 26 ± 1 °C. El pH debe estar comprendido entre 6,5 y 8,5 y no debe variar en más de 1,5 dentro de este intervalo durante el ensayo. Si no se espera que el pH permanezca en este intervalo, habrá que ajustarlo antes de iniciar el ensayo. El ajuste del pH debe hacerse de forma que la concentración de la solución madre no cambie de forma significativa y no se produzca ninguna reacción química ni precipitación del producto problema. Se recomienda utilizar cloruro de hidrógeno (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) para corregir el pH en las soluciones que contengan el producto problema.

**Soluciones problema**

13. Las soluciones problema de las concentraciones seleccionadas se pueden preparar, por ejemplo, por dilución de una solución madre. Las soluciones madre se preparan preferiblemente por simple mezcla o agitación del producto problema en el agua de dilución por medios mecánicos (p. ej., mediante un agitador o ultrasonidos). Si el producto problema es difícil de disolver en agua, se deberán seguir los procedimientos descritos en el documento de orientación número 23 de la OCDE sobre sustancias y mezclas difíciles (28). Debe evitarse el uso de disolventes, aunque en algunos casos puede ser necesario utilizarlos para obtener una solución madre a la concentración deseada. Si se emplea un disolvente para facilitar la preparación de la solución madre, su concentración final no debe superar 100 µl/l y ha de ser la misma en todos los recipientes de ensayo. Si se usa un disolvente, se requiere un testigo de disolvente adicional.

**Mantenimiento de los peces reproductores**

14. Para la producción de huevos, se usa una población de peces cebra reproductores a tipo silvestre, no expuestos, con una tasa de fecundación de huevos bien documentada. Los peces no deben presentar signos de infección o enfermedad que puedan discernirse macroscópicamente ni deben haber recibido ningún tratamiento farmacéutico (agudo o profiláctico) en los dos meses anteriores al desove. Los peces reproductores deben mantenerse en acuarios con una capacidad de carga recomendada de 1 l de agua por pez y un fotoperiodo fijado de 12 — 16 horas (29) (30) (31) (32) (33). Hay que ajustar la velocidad de filtración óptima; deben evitarse las velocidades de

▼M7

filtración excesivas que provoquen grandes perturbaciones en el agua. Para conocer las condiciones de alimentación, consúltese el apéndice 2. Debe evitarse alimentar en exceso a los peces. Además, hay que supervisar la calidad del agua y la limpieza del acuario periódicamente y, si fuese necesario, restablecerlas a su estado inicial.

**Ensayos de competencia**

15. Como producto de referencia, debe ensayarse la 3,4-dicloroanilina [usada en estudios de validación (1) (2)], preferiblemente dos veces al año, en una gama completa de concentraciones-respuestas para comprobar la sensibilidad de la cepa de pez usada. Los laboratorios que lleven a cabo este ensayo por primera vez deben utilizar el producto de referencia. Un laboratorio puede utilizar este producto para demostrar su competencia técnica a la hora de realizar el ensayo antes de enviar los datos con fines reglamentarios.

**Producción de huevos**

16. Los huevos de pez cebra pueden producirse mediante grupos de desove (en recipientes de desove individuales) o mediante desove masivo (en los recipientes de mantenimiento). En el caso de los grupos de desove, los machos y las hembras (a razón de 2:1, por ejemplo) de un grupo reproductor se colocan en los recipientes de desove unas horas antes de que se inicie el período de oscuridad el día previo al ensayo. Como puede que a veces los grupos de desove de pez cebra no consigan desovar, se recomienda usar en paralelo al menos tres recipientes de desove. Para evitar las desviaciones genéticas, los huevos se recogen de un mínimo de tres grupos de reproductores, mezclados y seleccionados de forma aleatoria.

17. Para recoger los huevos, se colocan frascos de desove en los recipientes de desove o de mantenimiento antes de iniciar el período de oscuridad el día previo al ensayo o antes del inicio del período de luz el día del ensayo. Con el fin de evitar la depredación de los huevos por los peces cebra adultos, los frascos de desove se cubren con tela metálica inerte con una luz de malla apropiada (aprox. 2 ± 0,5 mm). Si se considera necesario, se pueden fijar plantas artificiales de material inerte (como plástico o vidrio) a la tela metálica para que actúen como estimulo de desove (3) (4) (5) (23) (35). Deben utilizarse materiales de plástico meteorizado que no liberen sustancias contaminantes, como ftalatos. El apareamiento, el desove y la fecundación tienen lugar en los 30 minutos siguientes al inicio del período de luz y los frascos de desove con los huevos recogidos se pueden retirar con cuidado. Se recomienda enjuagar los huevos con agua reconstituida después de recogerlos de los frascos de desove.

**Diferenciación de los huevos**

18. A 26 °C, los huevos fecundados sufren la primera segmentación después de unos quince minutos y las sucesivas segmentaciones sincrónicas forman blastómeros de 4, 8, 16 y 32 células (véase el apéndice 3) (35). En estas fases, los huevos fecundados pueden identificarse claramente por el desarrollo de una blástula.

PROCEDIMIENTO

**Condiciones de exposición**

19. Se exponen veinte embriones por concentración (un embrión por pocillo) al producto problema. Durante todo el ensayo, la exposición debe permitir mantenerse en el intervalo del ± 20 % de la concentración nominal del producto. Si esto no resulta posible en un sistema estático, deberá aplicarse un intervalo de renovación semiestático que sea práctico (p. ej., con una renovación cada 24 horas). En estos casos, las concentraciones de exposición deben verificarse como mínimo a la mayor concentración de ensayo y a la menor, al principio y al final de cada intervalo de exposición (véase el punto 36). Si no se puede mantener la concentración de exposición en el ± 20 % de la concentración nominal, deberán medirse todas las concentraciones al principio y al final de cada intervalo de exposición (véase el punto 36). Durante la renovación, se vigilará que los embriones estén siempre cubiertos por una pequeña cantidad de solución problema antigua para

▼M7

evitar que se sequen. Se puede adaptar el diseño del ensayo para cumplir los requisitos aplicables a los ensayos de determinadas sustancias [por ejemplo, sistemas dinámicos (24) o de dosificación pasiva (25) para las sustancias fácilmente degradables o muy adsorbentes (29) u otros sistemas para sustancias volátiles (36) (37)]. En cualquier caso, se procurará agredir lo menos posible a los embriones. Los recipientes de ensayo deben acondicionarse con las soluciones problema al menos 24 horas antes del inicio del ensayo. Las condiciones de ensayo se resumen en el apéndice 2.

**Concentraciones de ensayo**

20. Normalmente se necesitan cinco concentraciones del producto problema, espaciadas por un factor constante que no supere 2,2, para cumplir los requisitos estadísticos. Si se usan menos de cinco concentraciones, debe justificarse. La mayor concentración estudiada debe provocar preferiblemente una letalidad del 100 %, y la menor concentración estudiada no debe provocar preferiblemente ningún efecto observable, como se define en el punto 28. La realización de un ensayo de determinación del intervalo antes del ensayo definitivo permite seleccionar los rangos de concentración adecuados. La determinación del intervalo se suele llevar a cabo usando diez embriones por concentración. Las instrucciones siguientes se refieren a un ensayo realizado con placas de 24 pocillos. Si se usan recipientes de ensayo diferentes (p. ej., placas de Petri pequeñas) o se someten a ensayo más concentraciones, habrá que adaptar las instrucciones como corresponda.

21. En el punto 27 y en la figura 1 del apéndice 4 se recogen información detallada e instrucciones visuales sobre la asignación de concentraciones en las placas de24 pocillos.

**Testigos**

22. Se requieren testigos del agua de dilución como testigo negativo y como testigos internos de las placas. Si se observa más de un embrión muerto en el testigo interno de la placa, esta se rechaza, con lo que se reduce el número de concentraciones utilizadas para deducir la $LC_{50}$. Si se rechaza una placa entera, puede resultar más difícil evaluar y discernir los efectos observados, sobre todo si la placa rechazada es la placa de testigo de disolvente o una placa que contiene embriones tratados. En el primer caso, habrá que repetir el ensayo. En el segundo caso, la pérdida de la totalidad de un grupo o de varios grupos de tratamiento debido a la mortalidad del testigo interno puede limitar la capacidad de evaluar los efectos y determinar los valores de la $LC_{50}$.

23. Se realiza un testigo positivo a una concentración fija de 4 mg/l de 3,4-dicloroanilina para cada lote de huevos utilizado en el ensayo.

24. Si se usa un disolvente, ha de exponerse un grupo adicional de 20 embriones al disolvente en una placa con 24 pocillos aparte, que servirá además como testigo de disolvente. Para que el ensayo se considere aceptable, hay que demostrar que el disolvente no influye de forma significativa en el tiempo de eclosión o en la supervivencia ni produce otros efectos adversos en los embriones (véase el punto 8, letra c).

**Inicio de la exposición y duración del ensayo**

25. El ensayo se inicia tan pronto como sea posible después de la fecundación de los huevos y termina tras 96 horas de exposición. Los embriones deben sumergirse en las soluciones de ensayo antes de que comience la división del blastodisco o, como muy tarde, en la fase de 16 células. Para que la exposición empiece lo antes posible, deben seleccionarse y transferirse de forma aleatoria al menos el doble del número de huevos necesarios por grupo de tratamiento a las concentraciones y testigos respectivos (p. ej., en placas de cristalización de 100 ml; los huevos deben estar cubiertos por completo) 90 minutos después de la fecundación como muy tarde.

26. Los huevos fecundados viables deben separarse de los huevos no fecundados y transferirse a placas de 24 pocillos acondicionadas previamente durante 24 horas y rellenas con 2 ml de soluciones problema recién preparadas en cada pocillo en los 180 minutos posteriores a la fecundación. Se utiliza un estereomicroscopio (preferiblemente al menos 30 aumentos) para seleccionar

▼M7

los huevos fecundados en fase de segmentación y que no muestren irregularidades evidentes durante la segmentación (como asimetría o formación de vesículas) ni lesiones del corion. Para obtener información sobre la recogida y separación de los huevos, véanse las figuras 1 y 3 del apéndice 3 y la figura 2 del apéndice 4.

**Distribución de los huevos en las placas de 24 pocillos**

27. Los huevos se distribuyen en las placas de pocillos de la siguiente manera (véase también la figura 1 del apéndice 4):

— 20 huevos en una placa para cada concentración de ensayo;

— 20 huevos como testigo de disolvente en una placa (si es necesario);

— 20 huevos como testigo positivo en una placa;

— 4 huevos en agua de dilución como testigo de placa interno en cada una de las placas anteriores;

— 24 huevos en el agua de dilución como testigo negativo en una placa.

**Observaciones**

28. Las observaciones principales realizadas en cada embrión de ensayo incluyen la coagulación de los embriones, la ausencia de formación de somitas, el no desprendimiento de la cola y la ausencia de latido cardíaco (cuadro 1). Estas observaciones se usan para determinar la letalidad: si el resultado de cualquiera de estas observaciones es positivo, significa que el embrión de pez cebra está muerto. Además, la eclosión se registra cada día en los grupos de tratamiento y testigo a partir de las 48 horas. Las observaciones se registran cada 24 horas hasta el final del ensayo.

*Cuadro 1.*

**Observaciones principales de toxicidad aguda en embriones de pez cebra 24-96 horas tras la fecundación.**

| | Períodos de exposición | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas |
| Embriones coagulados | + | + | + | + |
| Ausencia de formación de somitas | + | + | + | + |
| No desprendimiento de la cola | + | + | + | + |
| Ausencia de latido cardíaco | | + | + | + |

29. *Coagulación del embrión:* los embriones coagulados son de color blanco lechoso y aparecen oscuros en el microscopio (véase la figura 1 del apéndice 5). El número de embriones coagulados se determina después de 24, 48, 72 y 96 horas.

30. *Ausencia de formación de somitas:* a 26 ± 1 °C, se forman unas 20 somitas después de 24 horas (véase la figura 2 del apéndice 5) en un embrión de pez cebra que se desarrolla con normalidad. Un embrión con un desarrollo normal muestra movimientos espontáneos (contracciones de lado a lado). Estos movimientos espontáneos indican la formación de somitas. La ausencia de somitas se registra después de 24, 48, 72 y 96 horas. La ausencia de formación de somitas al cabo de 24 horas puede deberse a un retardo general del desarrollo. La formación de somitas debe desarrollarse como muy tarde después de 48 horas. Si no es así, los embriones se consideran muertos.

31. *No desprendimiento de la cola:* en un embrión de pez cebra con un desarrollo normal, se observa el desprendimiento de la cola (véase la figura 3 del

▼M7

apéndice 5) del saco vitelino tras la elongación posterior del cuerpo embrionario. La ausencia de desprendimiento de la cola se registra al cabo de 24, 48, 72 y 96 horas.

32. *Ausencia de latido cardíaco:* en un embrión de pez cebra con un desarrollo normal a 26 ± 1 °C, el latido cardíaco es visible después de 48 horas (véase la figura 4 del apéndice 5). Hay que prestar especial atención cuando se registre este parámetro, ya que los latidos cardíacos irregulares (inconstantes) no se deben registrar como letales. Además, unos latidos cardíacos apreciables sin circulación en la aorta abdominal se consideran no letales. Para registrar este parámetro, los embriones que no muestren latido cardíaco deben observarse con un aumento mínimo de 80x durante al menos un minuto. La ausencia de latido cardíaco se registra al cabo de 48, 72 y 96 horas.

33. Las tasas de eclosión de todos los grupos de tratamiento y de control deben registrarse a partir de las 48 horas e incluirse en el informe. Aunque la eclosión no es un parámetro utilizado para el cálculo de la $LC_{50}$, garantiza la exposición del embrión sin la función de barrera que puede realizar el corion y, por tanto, puede contribuir a la interpretación de los datos.

34. En los apéndices 3 y 5 se recogen descripciones detalladas del desarrollo normal (35) y ejemplos del desarrollo anómalo de los embriones de pez cebra.

**Mediciones analíticas**

35. Al principio y al final del ensayo se mide el pH, la dureza total y la conductividad en los testigos y en la mayor concentración del producto problema. En los sistemas de renovación semiestáticos, el pH debe medirse antes y después de la renovación del agua. La concentración de oxígeno disuelto se mide al final del ensayo en los testigos negativos y en la concentración de ensayo más alta con embriones viables; los resultados deben ser conformes con los criterios de validez del ensayo (véase el punto 8, letra f). Si existe el riesgo de que la temperatura varíe en las placas de 24 pocillos, la temperatura deberá medirse en tres recipientes seleccionados aleatoriamente. Debe registrarse la temperatura preferiblemente de forma continua durante la ensayo o, como mínimo, cada día.

36. En un sistema estático, la concentración del producto problema debe medirse, como mínimo, en la mayor concentración de ensayo y en la menor y preferiblemente en todos los tratamientos, al principio y el final del ensayo. En los ensayos semiestáticos (con renovación) en que la concentración del producto problema debe permanecer entre el ± 20 % de la concentración nominal, se recomienda analizar, como mínimo, la mayor concentración de ensayo y la menor en cuanto se preparen e inmediatamente antes de su renovación. En los ensayos en los que no se espere que la concentración del producto problema se mantenga dentro del ± 20 % de la concentración nominal, es preciso analizar todas las concentraciones de ensayo recién preparadas e inmediatamente antes de su renovación. Si el volumen es insuficiente para el análisis, puede resultar útil mezclar soluciones problema o utilizar recipientes sustitutos del mismo material y con la misma relación volumen/superficie que las placas de 24 pocillos. Se recomienda encarecidamente basar los resultados en las concentraciones medidas. Cuando las concentraciones no permanezcan en el intervalo del 80-120 % de la concentración nominal, se deberán expresar las concentraciones con efecto en relación con la media geométrica de las concentraciones medidas [véase el capítulo 5 del documento de orientación de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática de sustancias y mezclas difíciles (28)].

ENSAYO LÍMITE

37. Siguiendo los procedimientos descritos en el presente método de ensayo, puede efectuarse un ensayo límite con 100 mg/l de producto problema o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo, si este es inferior, a fin de demostrar que la $LC_{50}$ es mayor que esta concentración. El ensayo límite deberá realizarse con 20 embriones en el tratamiento, el testigo positivo y, si es necesario, en el testigo del disolvente y 24 embriones en el testigo

▼M7

negativo. Si el porcentaje de letalidad en la concentración estudiada supera la mortalidad en el testigo negativo (o testigo del disolvente) en un 10 %, deberá realizarse un estudio completo. Deben registrarse los efectos observados. Si la mortalidad excede el 10 % en el testigo negativo (o el testigo del disolvente), el ensayo no será válido y deberá repetirse.

DATOS E INFORME

**Tratamiento de los resultados**

38. En este ensayo, los pocillos individuales se consideran réplicas independientes para el análisis estadístico. Los porcentajes de los embriones para los cuales al menos una de las observaciones principales tiene un resultado positivo al cabo de 48 o 96 horas se representarán gráficamente según las concentraciones de ensayo. Para calcular las pendientes de la curva, los valores de la $LC_{50}$ y los límites de confianza (95 %), deben aplicarse métodos estadísticos adecuados (38) y hay que consultar el documento de orientacion de la OCDE sobre los enfoques actuales en el análisis estadístico de datos de ecotoxicidad (39).

**Informe del ensayo**

39. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Procucto problema:*

Sustancias de un solo componente

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nomenclatura IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILE o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica (incluido el contenido de carbono orgánico, si procede).

Sustancias de componentes múltiples, sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos (UVCB) y mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el párrafo anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Organismos de ensayo:*

— denominación científica, variedad, fuente y método de recogida de los huevos fecundados y manipulaciones posteriores.

*Condiciones de ensayo:*

— procedimiento de ensayo aplicado (p. ej., renovación semiestática);

— fotoperiodo:

— diseño del ensayo (p. ej., número de recipientes de ensayo, tipos de testigos);

— calidad del agua de mantenimiento de los peces (p. ej. pH, dureza, temperatura, conductividad, oxígeno disuelto);

— concentración de oxígeno disuelto, pH, dureza total, temperatura y conductividad de las soluciones problema al inicio y al cabo de 96 horas;

— método de preparación de las soluciones madre y las soluciones de ensayo, así como frecuencia de la renovación;

▼M7

— justificación del uso de disolvente y justificación de la elección del mismo (si no es agua);

— las concentraciones nominales de ensayo y el resultado de todos los análisis para determinar la concentración del producto problema en los recipientes de ensayo; también deben indicarse la eficiencia de recuperación del método y el límite de cuantificación (LoQ);

— datos que demuestren que los testigos cumplen los criterios generales de validez de supervivencia;

— tasa de fecundación de los huevos;

— tasa de eclosión en los grupos de tratamiento y de testigo.

*Resultados:*

— concentración máxima que no haya causado mortalidad durante el período de ensayo;

— concentración mínima que haya causado un 100 % de mortalidad durante el período de ensayo;

— mortalidad acumulativa para cada concentración en los períodos de observación recomendados;

— valores de la $LC_{50}$ al cabo de 96 horas (y de forma opcional al cabo de 48 horas) para la mortalidad con límites de confianza del 95 %, si es posible;

— representación gráfica de la curva de concentración-mortalidad al final del ensayo;

— mortalidad en los testigos (testigos negativos, testigos internos de la placa, así como testigo positivo y cualquier testigo de disolvente utilizado);

— datos sobre los resultados de cada una de las cuatro observaciones principales;

— incidencia y descripción de las anomalías morfológicas y fisiológicas, en su caso (véanse los ejemplos proporcionados en la figura 2 del apéndice 5);

— incidentes durante el ensayo que puedan haber influido en los resultados;

— análisis estadístico y tratamiento de los datos (análisis de probit, modelo de regresión logística y media geométrica para la $LC_{50}$);

— la pendiente y los límites de confianza de la regresión de la curva concentración (transformada)-respuesta.

*Cualquier desviación respecto al método de ensayo y explicaciones relevantes.*

*Evaluación e interpretación de los resultados.*

BIBLIOGRAFÍA

(1) OCDE (2011). Validation Report (Phase 1) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II. Series on Testing and Assessment No. 157, OECD, Paris.

(2) OCDE (2012). Validation Report (Phase 2) for the Zebrafish Embryo Toxicity Test: Part I and Part II (Annexes). Series on Testing and Assessment No. 179, OECD, Paris.

(3) Braunbeck, T., Böttcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M. and Seitz, N. (2005). Towards an alternative for the acute

▼M7

fish $LC_{50}$ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species-an update. ALTEX 22: 87-102.

(4) ISO (2007). International Standard Water quality — Determination of the acute toxicity of waste water to zebrafish eggs (*Danio rerio*). ISO 15088:2007(E) International Organization for Standardization.

(5) Nagel, R. (2002). DarT: The embryo test with the zebrafish (*Danio rerio*) — a general model in ecotoxicology and toxicology. ALTEX 19: 38-48.

(6) Schulte, C. and Nagel, R. (1994). Testing acute toxicity in embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22, 12-19.

(7) Bachmann, J. (2002). Development and validation of a teratogenicity screening test with embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). PhD-thesis, Technical University of Dresden, Germany.

(8) Lange, M., Gebauer, W., Markl, J. and Nagel, R. (1995). Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish (*Brachydanio rerio*), and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test. Chemosphere 30/11: 2087-2102.

(9) Knöbel, M., Busser, F.J.M., Rico-Rico, A., Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Hafner, C., Tanneberger, K., Schirmer, K., Scholz, S. (2012). Predicting adult fish acute lethality with the zebrafish embryo: relevance of test duration, endpoints, compound properties, and exposure concentration analysis. Environ. Sci. Technol. 46, 9690-9700.

(10) Kammann, U., Vobach, M. and Wosniok, W. (2006). Toxic effects of brominated indoles and phenols on zebrafish embryos. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 51: 97-102.

(11) Groth, G., Kronauer, K. and Freundt, K.J. (1994). Effects of *N,N*-diemethylformamide and its degradation products in zebrafish embryos. Toxicol. *In Vitro* 8: 401-406.

(12) Groth, G., Schreeb, K., Herdt, V. and Freundt, K.J. (1993). Toxicity studies in fertilized zebrafish fish eggs treated with *N*-methylamine, *N,N*-dimethylamine, 2-aminoethanol, isopropylamine, aniline, *N*-methylaniline, *N,N*-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50: 878-882.

(13) Nguyen, L.T. and Janssen, C.R. (2001). Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assays with African catfish (*Clarias gariepinus*) and zebra fish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 16: 566-571.

(14) Cheng, S.H., Wai, A.W.K., So, C.H. and Wu, R.S.S. (2000). Cellular and molecular basis of cadmium-induced deformities in zebrafish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 19: 3024-3031.

(15) Belanger, S. E., Rawlings J. M. and Carr G. J. (2013). Use of Fish Embryo Toxicity Tests for the Prediction of Acute Fish Toxicity to Chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry 32: 1768-1783.

(16) Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., Braunbeck, T. (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.: 149 (2), 196-209

(17) Capítulo C.4 del presente anexo, Biodegradabilidad fácil.

(18) Capítulo C.29 del presente anexo, Biodegradabilidad fácil, $CO_2$ en recipientes sellados.

(19) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. Toxicology 281: 25-36.

▼M7

(20) Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., Broschard, T.H. (2012). Developmental effects of coumarin and the anticoagulant coumarin derivative warfarin on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Reprod. Toxicol. 33: 133-141.

(21) Incardona, J.P, Linbo, T.L., Scholz, N.L. (2011). Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. Toxicol. Appl. Pharmacol. 257: 242-249.

(22) Kubota, A., Stegeman, J.J., Woodin, B.R., Iwanaga, T., Harano, R., Peterson, R.E., Hiraga, T., Teraoka, H. (2011). Role of zebrafish cytochrome P450 CYP1C genes in the reduced mesencephalic vein blood flow caused by activation of AHR2. Toxicol. Appl. Pharmacol. 253: 244-252.

(23) Capítulo C.48 del presente anexo, Ensayo de reproducción de peces a corto plazo. Véase el apéndice 4A.

(24) Lammer, E., Kamp, H.G., Hisgen, V., Koch, M., Reinhard, D., Salinas, E.R., Wendlar, K., Zok, S., Braunbeck, T. (2009). Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*). Toxicol. *in vitro* 23: 1436-1442.

(25) Brown, R.S., Akhtar, P., Åkerman, J., Hampel, L., Kozin, I.S., Villerius, L.A., Klamer, H.J.C., (2001). Partition controlled delivery of hydrophobic substances in toxicity tests using poly(dimethylsiloxane) (PDMS) films. Environ. Sci. Technol. 35, 4097–4102.

(26) Schreiber, R., Altenburger, R., Paschke, A., Küster, E. (2008). How to deal with lipophilic and volatile organic substances in microtiter plate assays. Environ. Toxicol. Chem. 27, 1676-1682.

(27) ISO (1996). International Standards. Water quality — Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [http://www.iso.org].

(28) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Series on Testing and Assessment No. 23, OECD, Paris.

(29) Laale, H.W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio*, in fisheries research. A literature review. J. Fish Biol. 10: 121-173.

(30) Westerfield, M. (2007). The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 5th edition. Eugene, University of Oregon Press, Institute of Neuroscience, USA.

(31) Canadian Council on Animal Care (2005). Guidelines on: the Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing, ISBN: 0-919087-43-4 http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf

(32) Comisión Europea (2007). Recomendación de la Comisión 2007/526/CE, de 18 de junio de 2007, sobre las líneas directrices relativas al alojamiento y al cuidado de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos [notificada con el número C(2007) 2525] [http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:197:0001:0089:ES:PDF]

(33) Unión Europea (2010). Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Diario Oficial de la Unión Europea, L 276:33-79; 20.10.2010

http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:276:0033:0079:ES:PDF

(34) Nagel, R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (*Brachydanio rerio*, Ham.-Buch.). J. Appl. Ichthyol. 2: 173-181.

▼**M7**

(35) Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev. Dyn. 203: 253-310.

(36) Capítulo C.2 del presente anexo, Ensayo de inmovilización aguda de Daphnia sp.

(37) Weil, M., Scholz, S., Zimmer, M., Sacher, F., Duis, K. (2009). Gene expression analysis in zebrafish embryos: a potential approach to predict effect conentrations in the fish early life stage test. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1970-1978

(38) ISO (2006). International Standard. Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data ISO TS 20281. Available: [http://www.iso.org].

(39) OCDE (2006). Guidance Document on Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: a Guidance to Application. Series on Testing and Assessment No. 54. OECD, Paris.

(40) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper «Fish embryo toxicity assays». UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Parámetro principal**: parámetro que causa un efecto a nivel de la población.

**Blástula**: formación celular alrededor del polo animal que cubre una determinada parte del vitelo.

**Producto**: sustancia o mezcla.

**Epibolia**: proliferación masiva de células predominantemente epidérmicas en la fase de gastrulación del embrión y su movimiento del lado dorsal al ventral, mediante el cual las capas de células endodérmicas se internalizan en un proceso similar a la invaginación y el vitelo se incorpora al embrión.

**Ensayo dinámico**: ensayo con un flujo continuo de soluciones de ensayo por el sistema de ensayo durante la duración de la exposición.

**Testigo interno de la placa**: testigo interno que consiste en cuatro pocillos rellenos con agua de dilución por placa de 24 pocillos con el fin de identificar la posible contaminación de las placas por el fabricante o el investigador durante el procedimiento, y cualquier efecto de la placa que pueda influir en el resultado del ensayo (p. ej., gradiente de temperatura).

**IUPAC**: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

**Agua de mantenimiento**: agua en la que se practica la cría de los peces adultos.

**Concentración letal mediana ($LC_{50}$)**: concentración de un producto problema que se estima que mata al 50 % de los organismos de ensayo durante la duración del ensayo.

**Ensayo de renovación semiestático**: ensayo con una renovación regular de las soluciones de ensayo después de períodos definidos (p. ej., cada 24 horas).

**SMILES**: Sistema Simplificado de Registro de Líneas Moleculares.

**Somita**: en la fase de desarrollo embrionario de los vertebrados, las somitas son masas del mesodermo que se distribuyen lateralmente respecto al tubo neural y que darán origen a la dermis (dermatoma), los músculos esqueléticos (miotoma) y las vértebras (esclerotoma).

**Ensayo estático**: ensayo durante el cual las soluciones de ensayo permanecen sin cambios durante todo el ensayo.

**Producto problema**: toda sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**UVCB**: sustancia de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

▼M7

*Apéndice 2*

**MANTENIMIENTO, REPRODUCCIÓN Y CONDICIONES TÍPICAS PARA LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON EMBRIONES DE PEZ CEBRA**

| **Pez cebra (*Danio rerio*)** | | |
|---|---|---|
| Origen de la especie | | India, Birmania, Malaca, Sumatra |
| Dimorfismo sexual | | Hembras: vientre prominente cuando llevan huevos<br>Machos: más delgados, tinte naranja entre las rayas azules longitudinales (particularmente visible por la aleta anal) |
| Régimen de alimentación | | Alimento en escamas deshidratado (máx. 3 % del peso del pez por día) 3-5 veces al día + nauplios de artemia salina (de la especie *Artemia*) o dáfnidos pequeños del tamaño adecuado obtenidos de un origen no contaminado. Los alimentos vivos enriquecen el entorno, por lo que deben suministrarse siempre que sea posible. Para garantizar la calidad óptima del agua, la comida no consumida y los excrementos deberán evacuarse aproximadamente una hora después de proporcionar los alimentos. |
| Peso aproximado del pez adulto | | Hembras: 0,65 ± 0,13 g<br>Machos: 0,5 ± 0,1 g |
| Mantenimiento del pez parental | Iluminación | Bombillas fluorescentes (amplio espectro); 10-20 $\mu E/m^2/s$, 540-1 080 lux o 50-100 ft-c (niveles ambiente de laboratorio); fotoperiodo de 12-16 horas |
| | Temperatura del agua | 26 ± 1 °C |
| | Calidad del agua | $O_2 \geq 80$ % de la saturación, dureza: p. ej. ~30-300 mg/l $CaCO_3$, $NO_3^-$: ≤ 48 mg/l, $NH_4^+$ y $NO_2^-$: < 0,001 mg/l, cloro residual < 10 µg/l, cloro orgánico total < 25 ng/l, pH = 6,5 — 8,5 |
| | Otros criterios de calidad de las aguas | Partículas < 20 mg/l, carbono orgánico total < 2 mg/l, plaguicidas organofosforados totales < 50 ng/l, plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados < 50 ng/l |
| | Tamaño del recipiente para mantenimiento | P. ej., 180 l, 1 pez/l |
| | Depuración del agua | Permanente (filtros de carbón); otras posibilidades son combinaciones con un sistema de mantenimiento con renovación semiestática o con un sistema dinámico con renovación continua del agua |
| | Razón de machos/hembras recomendada para la reproducción | 2:1 (o desove masivo) |
| Recipientes de desove | | P. ej., recipientes de 4 l con fondo de rejilla de acero y plantas artificiales como estimulante de desove; placas de calefacción externas, o desove masivo dentro de los recipientes de mantenimiento. |
| Estructura y aspecto de los huevos | | Corion estable (es decir, muy transparente, no pegajoso, diámetro en torno a los 0,8-1,5 mm) |
| Tasa de desove | | Una sola hembra adulta desova al menos 50-80 huevos al día. Dependiendo de la cepa, las tasas de desove pueden ser considerablemente más altas. La tasa de fecundidad debe ser ≥ 70 %. En el caso de los peces que desovan por primera vez, las tasas de fecundidad de los huevos puedan ser más bajas en los primeros desoves. |
| Tipo de prueba | | Estática, semiestática con renovación, dinámica, 26 ± 1 °C, recipientes de ensayo acondicionados durante 24 horas (p. ej., placas con 24 pocillos con 2,5-5 ml por cavidad) |

▼M7

*Apéndice 3*

**DESARROLLO NORMAL DEL PEZ CEBRA A 26 °C**

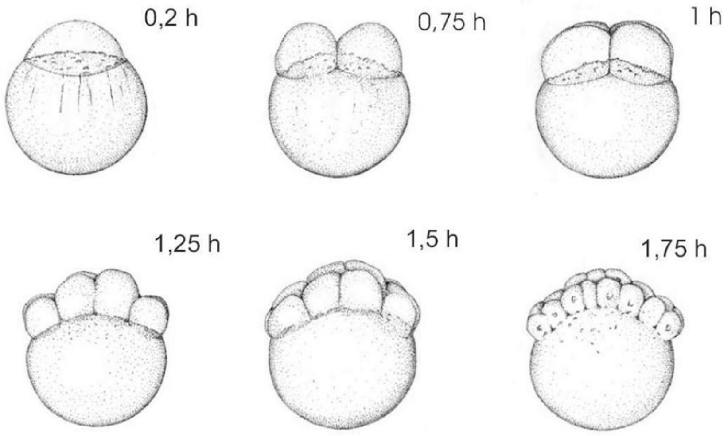



**Fig. 1. Selección de las primeras fases del desarrollo del pez cebra**: 0,2 — 1,75 h después de la fecundación [Kimmel *et al*., 1995 (35)]. Se puede tomar la secuencia temporal del desarrollo normal para diagnosticar la fecundación y la viabilidad de los huevos (véase el punto 26: «Selección de huevos fecundados»).

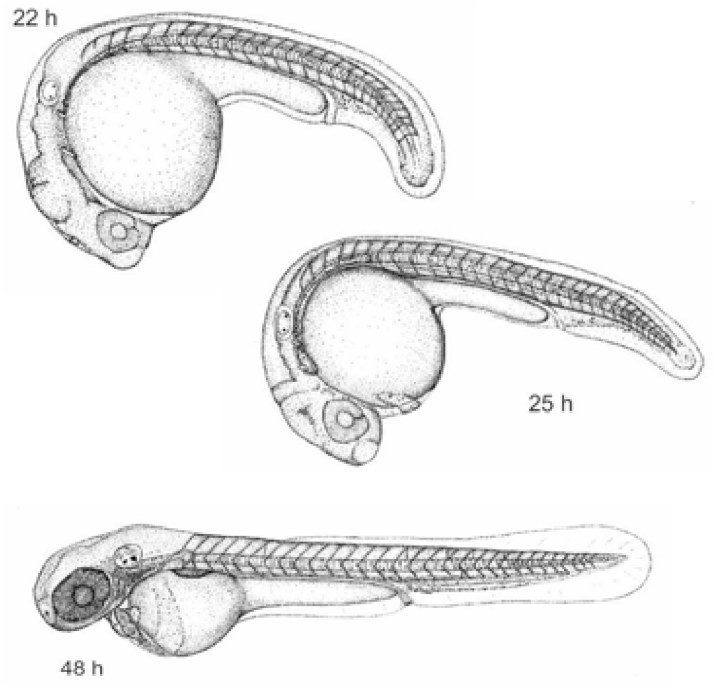



**Fig. 2. Selección de las fases tardías del desarrollo del pez cebra (*Danio rerio*) (embrión descorionado para optimizar la visibilidad)**: 22 — 48 h después de la fecundación [Kimmel *et al*., 1995 (35)].

▼M7

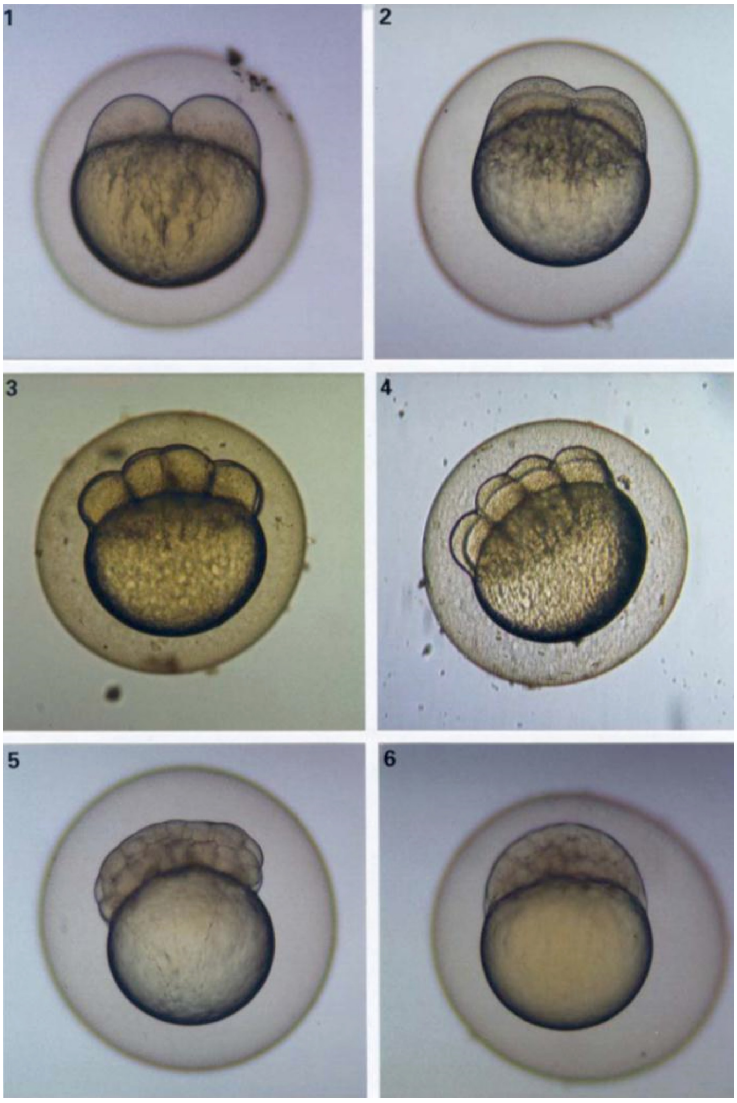


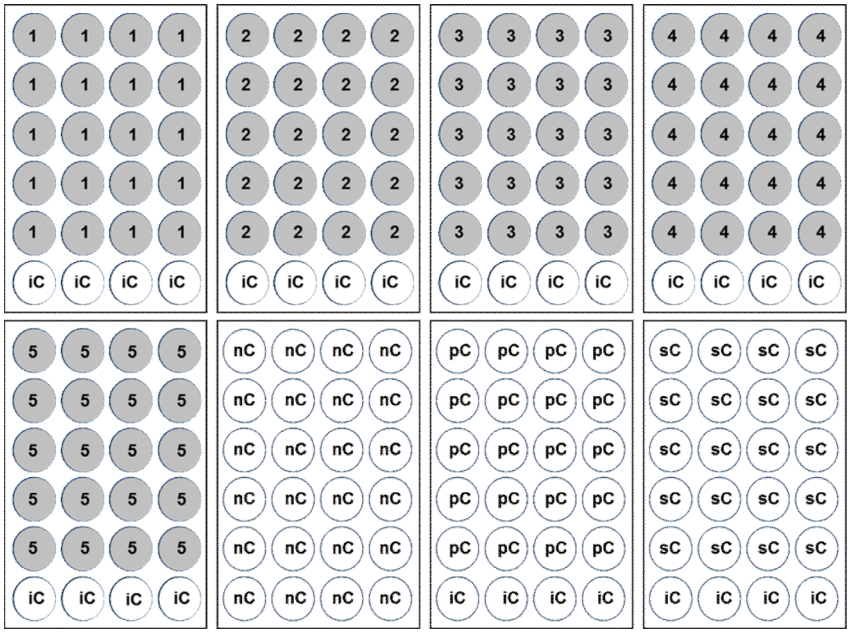

**Fig. 3. Desarrollo normal de embriones de pez cebra (*Danio rerio*):** (1) 0,75 h, fase de 2 células; (2) 1 h, fase de 4 células; (3) 1,2 h, fase de 8 células; (4) 1,5 h, fase de 16 células; (5) 4,7 h, inicio de la epibolia; (6) 5,3 h, aprox. 50 % de la epibolia [Braunbeck & Lammer 2006 (40)].

▼M7

*Apéndice 4*

*Fig. 1.*

**Distribución de las placas de 24 pocillos**




1-5 = cinco concentraciones de ensayo/producto;

nC = testigo negativo (agua de dilución);

iC = testigo interno de la placa (agua de dilución);

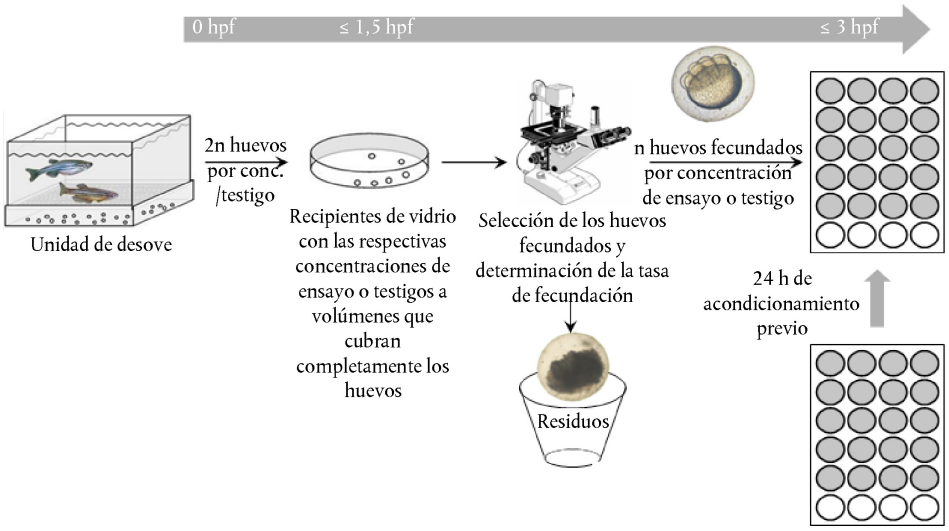
pC = testigo positivo (3,4-DCA 4mg/l);

sC = testigo del disolvente

▼M7

*Fig. 2.*

**Esquema del procedimiento de ensayo de toxicidad aguda en embriones de pez cebra (de izquierda a derecha): producción de los huevos, recogida de los huevos, exposición previa inmediatamente después de la fecundación en recipientes de vidrio, selección de huevos fecundados con un microscopio invertido o binocular y distribución de los huevos fecundados en placas de 24 pocillos preparadas con las respectivas concentraciones de ensayo/testigos, n = número de huevos requeridos por concentración de ensayo/ testigo (20 aquí), hpf = horas tras la fecundación**



▼M7

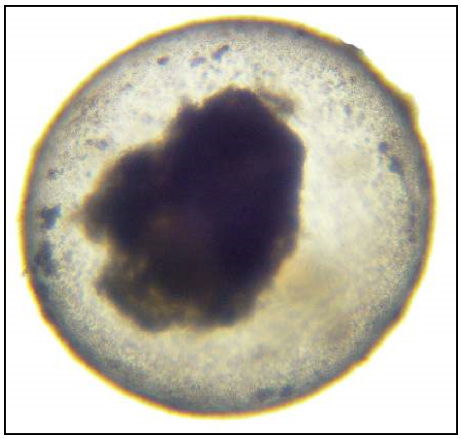
*Apéndice 5*

## ATLAS DE PARÁMETROS LETALES DEL ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA CON EMBRIONES DE PEZ CEBRA

Los siguientes parámetros principales indican toxicidad aguda y, por consiguiente, la muerte de los embriones: *coagulación de los embriones, no desprendimiento de la cola, ausencia de formación de somitas y ausencia de latido cardíaco.* Las siguientes microfotografías se han seleccionado para ilustrar estos parámetros.

*Fig. 1.*

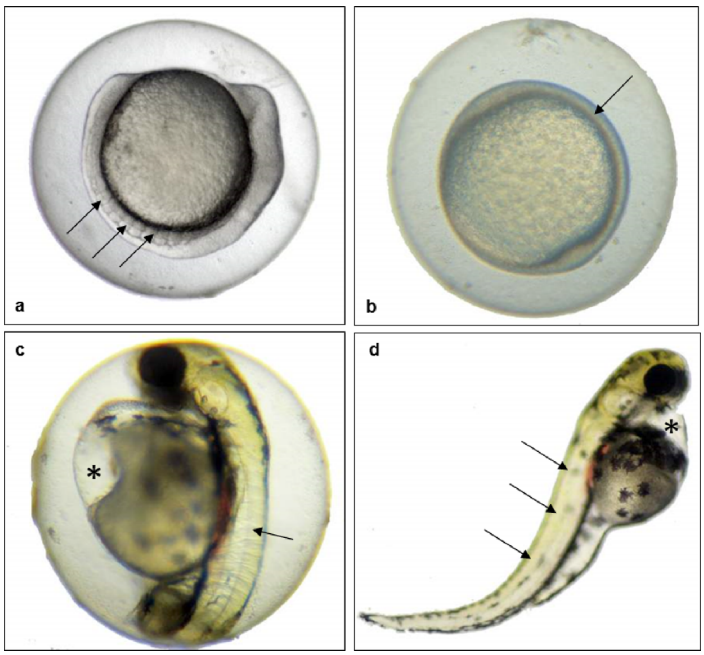
**Coagulación del embrión:**



Con iluminación a campo claro, los embriones de pez cebra coagulados muestran varias inclusiones opacas.

*Fig. 2.*

**Ausencia de formación de somitas:**

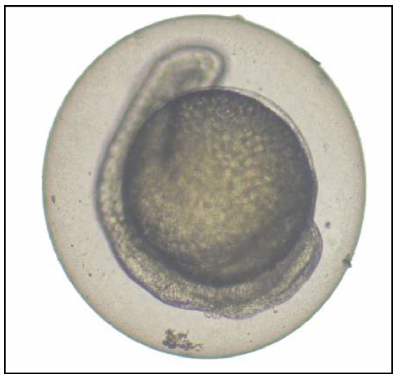


▼M7

Aunque tiene un retardo en el desarrollo de unas 10 horas, el embrión de pez cebra de 24 horas de (a) muestra unas somitas bien desarrolladas (→), mientras que el embrión de (b) no da muestras de formación de somitas (→). A pesar de que muestra un pronunciado edema en el saco vitelino (*), el embrión de pez cebra de 48 horas de (c) muestra una evidente formación de somitas (→), mientras que el embrión de 96 horas de (d) no da muestras de formación de somitas (→). Hay que observar además la curvatura vertebral (escoliosis) y el edema pericárdico (*) del embrión mostrado en (d).

*Fig. 3.*

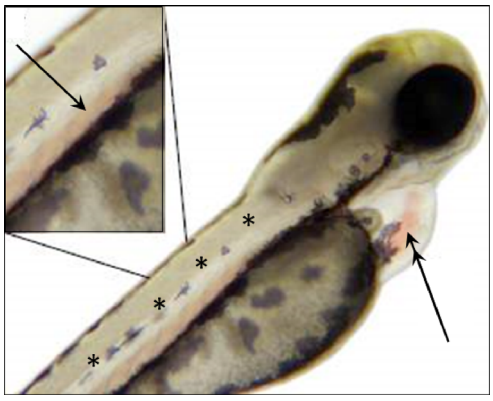
**No desprendimiento de la cola del embrión en la vista lateral**



(a: →; embrión de pez cebra de 96 horas). Hay que tener también en cuenta la ausencia de la vesícula óptica (*).

*Fig. 4.*

**Ausencia de latido cardíaco**




La **ausencia de latido cardíaco** resulta, por definición, difícil de ilustrar en una microfotografía. Se indica por la falta de convulsión del corazón (flecha doble). La inmovilidad de los glóbulos sanguíneos en, por ejemplo, la aorta abdominal (→ en la ampliación) no constituye un indicador de ausencia de latido cardíaco. Asimismo se observa la ausencia de formación de somitas en este embrión (*, aspecto homogéneo en lugar de segmentario de los tejidos musculares). El tiempo de observación para registrar la ausencia de latido cardíaco debe ser al menos de un minuto, con un aumento mínimo de 80×.

▼M7

## C.50. ENSAYO DE TOXICIDAD SIN SEDIMENTOS EN *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método reproduce las directrices de ensayo (TG) 238 de la OCDE (2014). Está diseñado para evaluar la toxicidad de productos en *Myriophyllum spicatum*, una especie de planta acuática sumergida, dicotiledónea del grupo de las milenrama. Se basa en un método existente de la ASTM (1) modificado para crear un sistema de ensayo sin sedimentos (2) con el fin de estimar la ecotoxicidad intrínseca de los productos problema (independientemente de cómo se distribuyan los productos problema entre el agua y el sedimento). Tiene una baja complejidad analítica (solo hay una fase acuosa) y los resultados se pueden analizar paralelamente o en comparación con los obtenidos en el ensayo con *Lemna* sp. (3). Además, las condiciones estériles requeridas permiten minimizar los efectos de los microorganismos y las algas (degradación/absorción del producto, etc.). El presente ensayo no sustituye a otros ensayos de toxicidad acuática, sino que los complementa para permitir una evaluación más completa de los peligros y riesgos para la flora acuática. Este método se ha validado mediante un ensayo interlaboratorios (4).

2. Se incluyen pormenores de los ensayos con renovación (semiestáticos) y sin renovación (estáticos) de la solución problema. En función de los objetivos del ensayo y de las imposiciones normativas, se recomienda aplicar un método semiestático, p. ej. en caso de sustancias que desparezcan rápidamente de la solución por volatilización, adsorción, fotodegradación, hidrólisis, precipitación o biodegradación. En la referencia (5) se dan más orientaciones. El presente método de ensayo se aplica a sustancias, para las que el ensayo se ha validado [véase más información en el informe del ensayo interlaboratorios (4)], a fórmulas o a mezclas conocidas. Si se somete a ensayo una mezcla, conviene identificar y cuantificar sus componentes en la medida de lo posible. El método de ensayo sin sedimentos en *Myriophyllum spicatum* complementa al ensayo de toxicidad agua-sedimento en *Myriophyllum spicatum* (6). Antes de utilizar el método de ensayo con fines normativos en una mezcla hay que considerar si proporcionará resultados adecuados para la finalidad reglamentaria en cuestión y, en caso de que sea así, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos reglamentarios estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

3. Se cultivan plantas de la especie *Myriophyllum spicatum* en crecimiento continuo (solo en el medio de Andrews modificado –véase el apéndice 2) como monocultivos expuestos a diferentes concentraciones del producto problema durante un plazo de catorce días en un sistema de ensayo sin sedimentos. El objetivo del ensayo es cuantificar los efectos relacionados con el producto sobre el crecimiento vegetativo a lo largo de este plazo, a partir de la evaluación de unas variables de medición seleccionadas. Dichas variables son el crecimiento de la longitud de los brotes, de las ramas laterales y de las raíces, la evolución del peso seco y fresco y el aumento del número de verticilos. Además, el ensayo tiene en cuenta modificaciones cualitativas particulares de los organismos de ensayo, como deformidades o clorosis y necrosis indicadas por un amarilleamiento o coloración blanca y marrón. Para cuantificar los efectos relacionados con el producto, se compara el crecimiento en las soluciones de ensayo con el de los testigos y se determina la concentración que ocasiona una inhibición del crecimiento de un porcentaje especificado, la cual se expresa como $EC_x$; «x» puede ser cualquier valor estipulado por las imposiciones normativas (p. ej., $EC_{10}$, $EC_{20}$ o $EC_{50}$). Hay que tener en cuenta que las estimaciones de los valores de la $EC_{10}$ y $EC_{20}$ solo son fiables y apropiadas en ensayos donde los coeficientes de variación de las plantas testigo son inferiores al nivel de efecto que está siendo estimado; es decir, los coeficientes de variación deben ser inferiores al 20 % para calcular de forma sólida la $EC_{20}$.

4. Se debe determinar tanto la tasa media de crecimiento específico (calculada a partir de la longitud del brote principal y la medición de otras tres variables) como el rendimiento (calculado a partir de la longitud del brote principal y la medición de otras tres variables) de las plantas testigo y las plantas tratadas.

▼M7

La tasa de crecimiento específico (r) y el rendimiento (y) se usan posteriormente para determinar la $E_rC_x$ (p. ej., $E_rC_{10}$, $E_rC_{20}$, $E_rC_{50}$) y $E_yC_x$ (p. ej., $E_yC_{10}$, $E_yC_{20}$, $E_yC_{50}$) respectivamente.

5. Además, pueden determinarse estadísticamente la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y la concentración sin efecto observado (NOEC).

INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO PROBLEMA

6. Debe contarse con un método analítico que tenga la sensibilidad adecuada para cuantificar el producto problema en el medio de ensayo. Entre la información sobre el producto problema que puede ser útil para establecer las condiciones del ensayo están los siguientes datos: fórmula estructural, pureza e impurezas, hidrosolubilidad, estabilidad en el agua y a la luz, constante de disociación ácida ($pK_a$), coeficiente de reparto ctanol/agua ($K_{ow}$), presión de vapor y biodegradabilidad. La hidrosolubilidad y la presión de vapor pueden utilizarse para calcular la constante de la ley de Henry, que indicará la probabilidad de la pérdida de cantidades significativas de producto problema durante el periodo de ensayo. Esto contribuirá a indicar si deben tomarse medidas particulares para limitar tal pérdida. Cuando sea dudosa la información sobre la solubilidad y la estabilidad del producto problema, se recomienda que se evalúen dichos aspectos en las condiciones del ensayo, es decir, con el medio de cultivo, la temperatura y el régimen de iluminación que se vayan a utilizar en el ensayo.

7. El control del pH del medio de ensayo es particularmente importante, por ejemplo cuando se estudien metales o sustancias hidrolíticamente inestables. Se ofrece más orientación sobre los ensayos de productos con propiedades fisicoquímicas que dificultan estos ensayos en un documento de orientación de la OCDE (5).

VALIDEZ DEL ENSAYO

8. Para que el ensayo sea válido, el tiempo de duplicación de la longitud del brote principal en el testigo debe ser inferior a 14 días. Con los medios y condiciones de ensayo descritos en el presente método, este criterio puede cumplirse utilizando un régimen estático o semiestático.

9. En los cultivos de testigo, el coeficiente de variación media del rendimiento basado en las mediciones del peso fresco de los brotes (es decir, desde el inicio del ensayo hasta el fin del ensayo) y en las otras variables medidas (véase el punto 37) no debe superar el 35 % entre réplicas.

10. Más del 50 % de las réplicas del grupo testigo deben mantenerse estériles durante el periodo de exposición de 14 días; esto quiere decir que no debe observarse contaminación de otros organismos, como algas, hongos y bacterias (la solución deberá estar clara). *Nota*: En el informe del ensayo interlaboratorios (4) se ofrecen orientaciones sobre cómo evaluar la esterilidad.

PRODUCTO DE REFERENCIA

11. Para comprobar el procedimiento del ensayo pueden someterse a ensayo uno o varios productos de referencia, como el 3,5-diclorofenol utilizado en el ensayo interlaboratorios (4). A partir de los resultados del ensayo interlaboratorios, los valores medios de la $EC_{50}$ del 3,5-DCP para las diferentes variables estudiadas (véanse los puntos 37-41 del presente método de ensayo) se encuentran entre 3,2 mg/l y 6,9 mg/l (véase el informe del ensayo interlaboratorios para obtener más información sobre el intervalo de confianza de dichos valores). Se recomienda efectuar un ensayo con un producto de referencia al menos dos veces al año o, si la frecuencia de los ensayos es menor, en paralelo con la determinación de la toxicidad de un producto problema.

▼M7

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

12. Todo el equipo que entre en contacto con los medios de ensayo será de vidrio o de otro material químicamente inerte. El material de vidrio utilizado para el cultivo y el ensayo estará limpio de contaminantes químicos que puedan pasar al medio de ensayo y además será estéril. Los recipientes de ensayo tendrán la longitud suficiente para que los brotes de los recipientes testigo puedan crecer en la fase acuosa sin llegar a la superficie del medio de ensayo al final del ensayo. Se recomienda utilizar tubos de ensayo de vidrio de borosilicato con paredes gruesas, sin reborde con un diámetro interno de 20 mm aproximadamente, una longitud aproximada de 250 mm y tapones de aluminio.

13. Dado que el medio modificado de Andrews contiene sacarosa (que estimula el crecimiento de hongos y bacterias), las soluciones problema deben prepararse en condiciones estériles. Todos los líquidos y el equipo deberán esterilizarse antes de su uso. Dicha esterilización se llevará a cabo mediante tratamiento con aire caliente (210 °C) durante 4 horas o en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Además, todos los matraces, placas, cubetas y el resto del equipo deben someterse a flameado en una mesa de laboratorio estéril justo antes de su uso.

14. No se deben mantener juntos los cultivos y los recipientes de ensayo, y la mejor forma de conseguirlo es utilizar cámaras, incubadoras o salas de cultivo aparte. Debe ser posible regular la iluminación y la temperatura, y mantenerlas a nivel constante.

**Organismo de ensayo**

15. *Myriophyllum spicatum* es una especie de planta acuática sumergida dicotiledónea del grupo de las milenrama. Entre junio y agosto produce discretas flores de color rosa-blanco que sobresalen por encima de la superficie del agua. Las plantas enraízan en el suelo mediante un sistema de rizomas robustos y pueden encontrarse en todo el hemisferio norte en aguas eutróficas (pero no contaminadas), estancadas, muy calcáreas, con sustrato fangoso. *Myriophyllum spicatum* prefiere el agua dulce, pero también se encuentra en aguas salobres.

16. Para el ensayo de toxicidad sin sedimentos se requieren plantas estériles. Si el laboratorio de ensayo no tiene cultivos regulares de *Myriophyllum spicatum*, se puede obtener material vegetal estéril de otro laboratorio o se pueden recoger muestras de la naturaleza u obtenerse de un proveedor comercial (en estos casos no sería material estéril). Si las plantas proceden del campo, habrá que realizar una verificación taxonómica de la especie. Si se recogen de la naturaleza o se obtienen de un proveedor comercial, las plantas deben esterilizarse (1) y mantenerse cultivadas en el mismo medio que se vaya a utilizar para el ensayo al menos en las ocho semanas anteriores a esta utilización. Los lugares de la naturaleza utilizados para recoger los cultivos iniciales deben estar libres de fuentes de contaminación evidentes. Hay que tener sumo cuidado para garantizar que se recoge la especie correcta de *Myriophyllum spicatum* de la naturaleza, especialmente en aquellas regiones donde puede haber híbridos con otras especies de *Myriophyllum*. Si se obtienen de otro laboratorio, los cultivos deben mantenerse similarmente durante un mínimo de tres semanas. En el informe han de indicarse siempre el origen y la especie del material vegetal utilizado para el ensayo.

17. La calidad y la uniformidad de las plantas empleadas en el ensayo tienen una influencia significativa sobre el resultado del mismo, por lo que deben seleccionarse con cuidado. Han de utilizarse plantas jóvenes, en fase de crecimiento rápido, que no presenten lesiones visibles ni cambios de color (clorosis). En el apéndice 4 se recoge más información sobre la preparación de los organismos de ensayo.

**Cultivo**

18. Para reducir la frecuencia del mantenimiento del cultivo (p. ej., cuando no esté previsto efectuar ensayos con *Myriophyllum* durante cierto tiempo), es posible mantener los cultivos en condiciones de iluminación y temperatura reducidas (50 μE $m^{-2}$ $s^{-1}$, 20 ± 2 °C). En el apéndice 3 se recoge información sobre el mantenimiento de los cultivos.

▼M7

19. Al menos entre catorce y veintiún días antes del ensayo, debe transferirse asépticamente a un medio estéril nuevo un número suficiente de organismos de ensayo, que se cultivarán como precultivo durante un período comprendido entre catorce y veintiún días en las condiciones del ensayo. En el apéndice 4 se recoge más información sobre la preparación de un precultivo.

**Medio de ensayo**

20. Se recomienda utilizar un único medio nutritivo para *Myriophyllum spicatum* en un sistema de ensayo sin sedimentos, como se describe en el apéndice 2. Además, es recomendable modificar el medio de Andrews para el cultivo de *Myriophyllum spicatum* y los ensayos en esta especie, como se describe en la referencia (1). El medio de Andrews modificado se prepara a partir de cinco soluciones madre de nutrientes preparadas por separado y a las cuales se le añade un 3 % de sacarosa. En el apéndice 2 se recoge más información sobre la preparación del medio.

21. Las soluciones de ensayo se obtienen a partir de un medio de Andrews modificado y concentrado diez veces que se diluye según sea necesario. La composición de este medio se indica en el apéndice 2.

**Soluciones de ensayo**

22. Las soluciones de ensayo se preparan normalmente diluyendo una solución madre. En principio, las soluciones madre del producto problema se preparan disolviendo este en agua desmineralizada (es decir, agua destilada o desionizada). El medio de Andrews modificado concentrado diez veces permite añadir los nutrientes.

23. Las soluciones madre del producto problema pueden esterilizarse en autoclave a 121 °C durante 20 minutos o mediante esterilización por filtración, siempre que la técnica de esterilización utilizada no desnaturalice el producto problema. Asimismo, las soluciones de ensayo se pueden preparar con un medio o agua desmineralizada estériles, en condiciones estériles. Habrá que tener en cuenta la termoestabilidad y la adsorción a diferentes superficies para seleccionar el procedimiento de esterilización de las soluciones madre del producto problema. Por ello, se recomienda preparar las soluciones madre en condiciones estériles, es decir, utilizando material estéril para disolver el producto problema en condiciones estériles (por ejemplo, esterilización por flameado, campana de flujo laminar, etc.) en agua estéril. Esta técnica de preparación de las soluciones madre estériles es válida tanto para sustancias como para mezclas.

24. La mayor concentración estudiada del producto problema no debe superar como norma su hidrosolubilidad en las condiciones de ensayo. En caso de productos problema de escasa hidrosolubilidad, puede ser necesario preparar una dispersión o solución madre concentrada del producto con un dispersante o un disolvente orgánico para facilitar la adición de cantidades exactas del producto problema al medio de ensayo y ayudar a su dispersión y disolución. No obstante, debe evitarse en la mayor medida posible el empleo de tales materiales. El uso de disolventes o dispersantes auxiliares no debe provocar fitotoxicidad. Por ejemplo, entre los disolventes utilizados frecuentemente que no causan fitotoxicidad a concentraciones de hasta 100 µl/l figuran la acetona y la dimetilformamida. Si se utiliza un disolvente o dispersante, su concentración final se indicará en el informe y se mantendrá a un nivel mínimo (≤ 100 µl/l), y todos los testigos y tratamientos contendrán la misma concentración de disolvente o dispersante. En la referencia (5) se da más información sobre el uso de dispersantes.

**Grupos de ensayo y testigos**

25. Para seleccionar las concentraciones de ensayo adecuadas es útil disponer de datos anteriores sobre la toxicidad del producto problema para *Myriophyllum spicatum* procedentes de un ensayo de determinación del intervalo. En el ensayo de toxicidad definitivo debe haber por lo general entre cinco (como en la prueba de inhibición del crecimiento de *Lemna*, capítulo C.26 del presente anexo) y siete

▼M7

concentraciones de ensayo dispuestas en una serie geométrica; dichas concentraciones deben seleccionarse de forma que los valores de NOEC y la $EC_{50}$ queden comprendidos en el intervalo de concentración (véase más adelante). Lo mejor es que la razón entre las concentraciones de ensayo no sea más de 3,2, pero puede utilizarse un valor superior si la curva concentración-respuesta es plana. Si se usan menos de cinco concentraciones, hay que justificarlo. De cada concentración de ensayo se deben utilizar al menos cinco réplicas.

26. Al fijar el abanico de concentraciones de ensayo (para el ensayo de determinación del intervalo o para el ensayo definitivo de toxicidad), hay que tenerse en cuenta lo siguiente:

Para determinar una $EC_x$, es necesario que las concentraciones de ensayo abarquen el valor de $EC_x$ a fin de asegurar un nivel adecuado de confianza. Por ejemplo, si se estima la $EC_{50}$, la mayor concentración de ensayo debe ser superior al valor de $EC_{50}$. Si el valor de $EC_{50}$ se encuentra fuera del intervalo de las concentraciones de ensayo, los intervalos de confianza asociados serán amplios y quizá no sea posible efectuar una evaluación adecuada del ajuste estadístico del modelo.

Si el objetivo es estimar la LOEC/NOEC, la menor concentración de ensayo debe ser tan baja que el crecimiento correspondiente no sea significativamente inferior al del testigo. Por otra parte, la mayor concentración de ensayo debe ser tan alta que el crecimiento correspondiente sea significativamente inferior al del testigo. Si no es así, habrá que repetir el ensayo utilizando un intervalo diferente de concentraciones (salvo que la mayor concentración sea el límite de solubilidad o la concentración límite requerida máxima, por ejemplo 100 mg/l).

27. Cada ensayo debe incluir testigos con un medio nutritivo, organismo de ensayo (material vegetal elegido debe ser lo más homogéneo posible, las ramas laterales frescas de los precultivos se cortarán a 2,5 cm de la base), condiciones ambientales y procedimientos iguales que los de los recipientes de ensayo, pero sin el producto problema. Si se utiliza un disolvente o dispersante auxiliar, se incluirá un testigo adicional con el disolvente o dispersante presente en la misma concentración que en los recipientes con el producto problema. El número de réplicas de los recipientes testigo (y recipientes de disolvente, en su caso) será como mínimo de diez.

28. Si no es necesario determinar la NOEC, el diseño del ensayo puede modificarse para aumentar el número de concentraciones y reducir el número de réplicas por concentración. Sin embargo, el número de réplicas de los testigos debe ser siempre como mínimo de diez.

**Exposición**

29. Las ramas laterales frescas del precultivo recortadas a 2,5 cm de la base se asignan de forma aleatoria a los recipientes de ensayo en condiciones asépticas; cada recipiente de ensayo debe contener una rama lateral de 2,5 cm con un meristemo apical en un extremo. La calidad del material vegetal seleccionado debe ser la misma en todos los recipientes de ensayo.

30. Es necesario un diseño aleatorio de la distribución de los recipientes de ensayo en la incubadora para minimizar la influencia de las diferencias espaciales de intensidad luminosa o temperatura. También es necesario un diseño por bloques o una redistribución aleatoria de los recipientes cuando se hacen observaciones (o una redistribución más frecuente).

31. Si un ensayo preliminar de estabilidad indica que la concentración de producto problema no puede mantenerse (es decir, que la concentración medida cae por debajo del 80 % de la concentración medida inicialmente) a lo largo de la duración del ensayo (14 días), se recomienda un régimen de ensayo semiestático. En tal caso, las plantas deben exponerse a soluciones de ensayo

▼M7

y testigo recién preparadas en al menos una ocasión durante el ensayo (p. ej., en el día 7). La frecuencia de la exposición al medio fresco dependerá de la estabilidad del producto problema; puede ser necesaria una frecuencia mayor para mantener concentraciones cuasi constantes de productos muy inestables o volátiles.

32. La posibilidad de exposición mediante aplicación foliar (aerosol) no se contempla en el presente método de ensayo.

**Condiciones del ensayo**

33. Debe utilizarse una luz fluorescente blanca fría o cálida que dé una irradiancia de la luz de aproximadamente entre 100-150 μE $m^{-2}$ $s^{-1}$ cuando se mide como radiación activa para la fotosíntesis (400-700 nm) en puntos situados a la misma distancia de la fuente luminosa que el fondo de los recipientes de ensayo (equivalente a unos 6 000-9 000 lux) y usando un ciclo de luz-oscuridad de 16:8 horas. El método de detección y medición de la luz, en particular el tipo de sensor, influye en el valor medido. La utilización de sensores esféricos (que responden a la luz desde todos los ángulos por encima y por debajo del plano de medición) y de sensores de «coseno» (que responden a la luz desde todos los ángulos por encima del plano de medición) es mejor que la de sensores unidireccionales, y proporciona lecturas más elevadas con una fuente luminosa multipuntual del tipo que se describe aquí.

34. La temperatura de los recipientes de ensayo debe ser de 23 ± 2 °C. Es necesario prestar atención particular a la variación del pH en casos especiales, como cuando se estudian metales o productos inestables. El pH debe permanecer en un intervalo de 6-9. En la referencia (5) puede encontrarse más información al respecto.

**Duración**

35. El ensayo termina a los catorce días de la transferencia de las plantas a los recipientes de ensayo.

**Mediciones y determinaciones analíticas**

36. Al principio del ensayo, la longitud del brote principal del organismo de ensayo es de 2,5 cm (véase el punto 29). La longitud se mide con una regla (véase el apéndice 4) o mediante fotografía y análisis de la imagen. Es necesario determinar la longitud del brote principal de aspecto normal o anormal al inicio del ensayo, al menos una vez durante el período de exposición de catorce días y al final del ensayo. Nota: Los laboratorios que no puedan realizar el análisis por imagen también pueden utilizar una regla estéril para medir la longitud del brote principal al principio del ensayo y durante la exposición, siempre que la mesa del laboratorio haya sido esterilizada antes de colocar las plantas en los recipientes de ensayo. Deben anotarse los cambios observados en el desarrollo de las plantas como, por ejemplo, deformación en los brotes, aspecto, indicación de necrosis, clorosis, rotura o pérdida de flotabilidad, así como en la longitud y aspecto de las raíces. Asimismo, deben registrarse las características significativas del medio de ensayo (por ejemplo, presencia de material sin disolver o crecimiento de algas, hongos y bacterias en el recipiente de ensayo).

37. Además de determinar la longitud del brote principal durante el ensayo, hay que evaluar los efectos del producto problema sobre tres (o más) de las siguientes variables de medición:

i. Longitud total de las ramas laterales

ii. Longitud total de los brotes

iii. Longitud total de las raíces

iv. Peso fresco

v. Peso seco

▼M7

vi. Número de verticilos

*Nota 1:* Las observaciones realizadas durante el ensayo de determinación del intervalo pueden ayudar a seleccionar otras variables de medición relevantes entre las seis variables indicadas anteriormente.

*Nota 2:* Asimismo, se recomienda encarecidamente determinar los pesos fresco y seco (parámetros iv y v).

*Nota 3:* Dado que la sacarosa y la luz (exposición de las raíces a la luz durante el ensayo) pueden afectar a los transportadores de la auxina (hormona de crecimiento de la planta) y que determinados productos pueden tener un modo de acción similar al de la auxina, la inclusión de parámetros relacionados con las raíces (parámetro iii) es cuestionable.

*Nota 4:* Los resultados del ensayo interlaboratorios muestran elevados coeficientes de variación (superiores al 60 %) para la longitud total de las ramas laterales (parámetro i). En cualquier caso, la longitud total de las ramas laterales está comprendida dentro de la longitud total de los brotes (parámetro ii), que muestra coeficientes de variación más aceptables, inferiores al 30 %.

*Nota 5:* De las consideraciones anteriores se deriva que los principales parámetros de medición recomendados son la longitud total de los brotes, el peso fresco y el peso seco (parámetros ii, iv y v); el número de verticilos (parámetro vi) se deja a discreción del experimentador.

38. La longitud del brote principal y el número de verticilos tienen la ventaja de que pueden determinarse en cada recipiente de ensayo y testigo al principio y al final del ensayo, así como durante el mismo, mediante fotografía y análisis de la imagen; también puede utilizarse una regla (estéril).

39. La longitud total de las ramas laterales, la longitud total de las raíces (como suma de las longitudes de todas las ramas laterales o raíces) y la longitud total de los brotes (como suma de la longitud del brote principal y de la longitud de las ramas laterales) puede medirse con una regla al final del período de exposición.

40. El peso seco o fresco debe determinarse al principio del ensayo a partir de una muestra del precultivo representativa del material utilizado para empezar el ensayo, y al final de este con el material vegetal de cada recipiente de ensayo y testigo.

41. La longitud total de las ramas laterales, la longitud total de los brotes, la longitud total de las raíces, el peso fresco, el peso seco y el número de verticilos pueden determinarse de la siguiente manera:

i. Longitud total de las ramas laterales: la longitud de las ramas laterales se puede determinar midiendo todas las ramas laterales con una regla al final del período de exposición. La longitud total de las ramas laterales es la suma de las longitudes de todas las ramas laterales de cada recipiente de ensayo y testigo.

ii. Longitud total de los brotes: la longitud del brote principal se puede determinar mediante un análisis de imagen o utilizando una regla. La longitud total de los brotes es la suma de la longitud total de las ramas laterales y la longitud del brote principal de cada recipiente de ensayo y testigo al final del período de exposición.

iii. Longitud total de las raíces: la longitud de las raíces se puede determinar midiendo todas las raíces con una regla al final del período exposición. La longitud total de las raíces es la suma de las longitudes de todas las raíces de cada recipiente de ensayo y testigo.

iv. Peso fresco: el peso fresco se puede determinar pesando los organismos de ensayo al final del período de exposición. Hay que enjuagar todo el material vegetal de cada recipiente de ensayo y testigo con agua destilada, y, a continuación, se seca dándole ligeros toquecitos con papel de

▼M7

celulosa. Tras esta etapa de preparación, se determina el peso fresco por pesada. La biomasa inicial (peso fresco) se determina a partir de una muestra de organismos de ensayo tomada del mismo lote utilizado para inocular los recipientes de ensayo.

v. Peso seco: después de las preparaciones necesarias para determinar el peso fresco, los organismos de ensayo se secan a 60 °C hasta llegar a un peso constante. Dicha masa corresponde al peso seco. La biomasa inicial (peso seco) se determina a partir de una muestra de organismos de ensayo tomada del mismo lote utilizado para inocular los recipientes de ensayo.

vi. Número de verticilos: se deben contar todos los verticilos del brote principal.

*Frecuencia de las mediciones y determinaciones analíticas*

42. Si se utiliza un diseño de ensayo estático, debe medirse el pH de cada tratamiento al inicio y al final del ensayo. Si el ensayo es semiestático, el pH debe medirse en cada lote de solución de ensayo «nueva» antes de cada renovación y también en las correspondientes soluciones «antiguas».

43. Debe medirse la intensidad luminosa en la cámara, incubadora o recinto de cultivo, en puntos situados a la misma distancia de la fuente luminosa que los organismos de ensayo. Esta medición debe efectuarse al menos una vez durante el ensayo. Debe registrarse al menos una vez al día la temperatura del medio en un recipiente indicador mantenido en las mismas condiciones en la cámara, incubadora o recinto de cultivo (o continuamente con un registrador de datos).

44. Las concentraciones del producto o productos problema se determinan durante el ensayo a intervalos adecuados. Con ensayos estáticos, el requisito mínimo es determinar las concentraciones al inicio y al final del ensayo.

45. Con ensayos semiestáticos en que no se prevea que las concentraciones del producto o productos problema permanezcan en el intervalo del ± 20 % de la concentración nominal, habrá que analizar todas las soluciones de ensayo recién preparadas y las mismas soluciones en cada renovación. No obstante, en los ensayos en los que las concentraciones iniciales medidas del producto o productos no estén dentro del intervalo del ± 20 % de la concentración nominal, pero en los que puedan aportarse pruebas suficientes de que las concentraciones iniciales son repetibles y estables (es decir, que están dentro del intervalo del 80 — 120 % de la concentración inicial), las determinaciones del producto podrían limitarse a las concentraciones de ensayo máxima y mínima. En todos los casos, la determinación de las concentraciones de ensayo antes de la renovación solo tendrá que efectuarse en uno de los recipientes replicados de cada concentración de ensayo (o en los contenidos de los recipientes reunidos por réplica).

46. Si hay indicios de que la concentración de ensayo se ha mantenido satisfactoriamente a lo largo de todo el ensayo dentro de un intervalo de ± 20 % de la concentración nominal o de la medida inicialmente, el análisis de los resultados puede basarse en los valores nominales o medidos inicialmente. Si la desviación respecto a la concentración nominal o medida inicialmente es superior al ± 20 %, el análisis de los resultados deberá basarse en la media geométrica de la concentración durante la exposición o en modelos que describan el descenso de la concentración del producto problema (5).

**Ensayo límite**

47. Bajo ciertas circunstancias (por ejemplo, cuando un ensayo preliminar indica que el producto problema no tiene efectos tóxicos a concentraciones de hasta 100 mg/l, o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo, o en el caso de una formulación hasta su límite de dispersión) puede efectuarse un ensayo límite comparando las respuestas de un grupo testigo y de un único grupo de tratamiento (100 mg/l o una concentración igual al límite de solubilidad). Se recomienda encarecidamente respaldar la realización de dicho ensayo con un análisis de la concentración de exposición. Todas las condiciones de ensayo y criterios de validez antes descritos son aplicables al

▼M7

ensayo límite, con la excepción de que el número de réplicas de tratamiento ha de duplicarse. El crecimiento en el grupo de testigo y en el de tratamiento puede analizarse mediante un método estadístico para comparar las medias como, por ejemplo, una prueba t de Student.

DATOS E INFORME

**Variables de respuesta**

48. El objetivo del ensayo es determinar los efectos del producto problema sobre el crecimiento vegetativo de *Myriophyllum spicatum*. El presente método de ensayo describe dos variables de respuesta.

a) Tasa media de crecimiento específico: esta variable de respuesta se calcula a partir de los cambios de los logaritmos de la longitud del brote principal y, además, a partir de los cambios de los logaritmos de otros parámetros de medición, como la longitud total de los brotes, el peso fresco, el peso seco o el número de verticilos a lo largo del tiempo (expresado en días) en los testigos y en cada grupo de tratamiento. Nota: Para los parámetros de medición longitud total de las ramas laterales y longitud total de las raíces no se puede calcular una tasa media de crecimiento específico. Al principio del ensayo, el organismo de ensayo no tiene ramas laterales ni raíces (según el método de preparación a partir del precultivo); como se empieza desde un valor nulo, no se puede calcular la tasa media de crecimiento específico.

b) Rendimiento: esta variable de respuesta se calcula a partir de los cambios en la longitud del brote principal y, además, a partir de los cambios de otros parámetros de medición (preferiblemente longitud total de los brotes, peso fresco, peso seco o número de verticilos) en los testigos y en cada grupo de tratamiento hasta el final del ensayo.

49. Las estimaciones de la toxicidad deben basarse en la longitud del brote principal y en tres variables de medición más (preferiblemente de longitud total de los brotes, el peso fresco, el peso seco o el número de verticilos; véanse el punto 37 y las notas 2, 4 y 5 de dicho punto), porque ciertos productos pueden afectar a otras variables de medición mucho más que a la longitud del brote principal. Este efecto no se detectaría si solo se calculara la longitud del brote principal.

*Tasa media de crecimiento específico*

50. La tasa media de crecimiento específico correspondiente a un período específico se calcula como el incremento logarítmico de las variables de crecimiento, es decir, longitud del brote principal y otras tres variables de medición (longitud total de los brotes, peso fresco, peso seco o número de verticilos), aplicando la fórmula siguiente a cada réplica de testigo y de tratamiento:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

donde:

$\mu_{i-j}$ es la tasa media de crecimiento específico entre el tiempo i y el j;

$N_i$ es la variable de medición del recipiente de ensayo o testigo en el tiempo i;

$N_j$ es la variable de medición del recipiente de ensayo o testigo en el tiempo j;

t es el tiempo transcurrido entre i y j.

▼M7

Respecto a cada grupo de tratamiento y testigo ha de calcularse un valor medio de la tasa de crecimiento y una estimación de la varianza.

51. Debe calcularse la tasa media de crecimiento específico correspondiente a toda la duración del ensayo (el tiempo i en la fórmula anterior es el principio del ensayo y el tiempo j es el final del mismo). Respecto a cada concentración de ensayo y el testigo ha de calcularse un valor promedio de la tasa media de crecimiento específico con una estimación de la varianza. Por otra parte, debe considerarse la tasa de crecimiento de cada sección para evaluar el efecto del producto problema presente durante el período de exposición (por ejemplo, examinando curvas logarítmicas de crecimiento).

52. Después puede calcularse el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento ($I_r$) correspondiente a cada concentración de ensayo (grupo de tratamiento) aplicando la fórmula siguiente:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

donde:

% $I_r$ es el porcentaje de inhibición de la tasa media de crecimiento específico;

$\mu_C$ es el valor promedio de μ en el grupo testigo;

$\mu_T$ es el valor promedio de μ en grupo de tratamiento.

*Rendimiento*

53. Los efectos sobre el rendimiento se determinan a partir de la medición de la longitud del brote principal y otras tres variables de medición más (preferiblemente, longitud total de los brotes, peso fresco, peso seco o número de verticilos) correspondientes a cada recipiente de ensayo al inicio y al final del ensayo. En el caso del peso fresco y el peso seco, la biomasa inicial se determina a partir de una muestra de organismos de ensayo tomada del mismo lote utilizado para inocular los recipientes de ensayo. Respecto a cada concentración de ensayo y testigo ha de calcularse un valor promedio del rendimiento con una estimación de la varianza. El porcentaje promedio de inhibición en rendimiento (% $I_y$) puede calcularse de la manera siguiente con cada grupo de tratamiento:

$$\%I_y = \frac{(b_c - b_T)}{b_c}$$

donde:

% $I_y$ es el porcentaje de reducción en rendimiento;

$b_C$ es la biomasa final menos la biomasa inicial correspondiente al grupo testigo;

$b_T$ es la biomasa final menos la biomasa inicial correspondiente al grupo de tratamiento.

*Tiempo de duplicación*

54. Para determinar el tiempo de duplicación ($T_d$) de la longitud del brote principal y el cumplimiento de este criterio de validez (véase el punto 8), se aplicará la fórmula siguiente con datos obtenidos de los recipientes testigo:

$T_d = \ln 2/\mu$

donde μ es la tasa media de crecimiento específico determinada como se describe en los puntos 50-52.

▼M7

**Trazado de las curvas concentración-respuesta**

55. Se deben trazar las curvas concentración-respuesta que relacionan el porcentaje medio de inhibición de la variable de respuesta ($I_r$ o $I_y$, calculado como se indica en el punto 53) con el logaritmo de la concentración del producto problema.

**Estimación de $EC_x$**

56. Las estimaciones de $EC_x$ deben basarse tanto en la tasa media de crecimiento específico ($E_rC_x$) como en el rendimiento ($E_yC_r$), cada uno de los cuales debe basarse, a su vez, en la longitud del brote principal y posiblemente en variables de medición adicionales (de preferencia, la longitud total de los brotes, el peso fresco, el peso seco o el número de verticilos). El motivo es que ciertos productos problema influyen de forma diferente en la longitud del brote principal y en otras variables de medición. Por tanto, los parámetros buscados de la toxicidad son cuatro valores de $EC_x$ por cada nivel de inhibición x calculado: $E_rC_x$ (longitud del brote principal); $E_rC_x$ (preferiblemente longitud total de los brotes, peso fresco, peso seco o número de verticilos); $E_yC_x$ (longitud del brote principal); y $E_yC_x$ (preferiblemente longitud total de los brotes, peso fresco, peso seco o número de verticilos).

57. Ha de señalarse que los valores de $EC_x$ calculados a partir de estas dos variables de respuesta no son comparables y es necesario tener en cuenta esta diferencia cuando se utilicen los resultados del ensayo. Los valores de $EC_x$ basados en la tasa media de crecimiento específico ($E_rC_x$) son en la mayoría de los casos más elevados que los basados en el rendimiento ($E_yC_x$) si se respetan las condiciones del presente método de ensayo, debido al fundamento matemático de los planteamientos respectivos. Esta diferencia no debe interpretarse como una diferencia en la sensibilidad de las dos variables de respuesta, sino como una diferencia puramente matemática entre los valores.

**Procedimientos estadísticos**

58. El objetivo es obtener una relación concentración-respuesta cuantitativa mediante análisis de regresión. Es posible utilizar una regresión lineal ponderada después de haber efectuado una transformación linealizante de los datos de respuesta como, por ejemplo, con modelos probit, logit o Weibull (7), pero son preferibles los procedimientos de regresión no lineal porque con ellos se tratan mejor las inevitables irregularidades de los datos y las desviaciones respecto a distribuciones regulares. Si la inhibición está próxima al 0 o al 100 %, la transformación puede magnificar tales irregularidades, interfiriendo así con el análisis (7). Debe señalarse que los métodos normales de análisis que utilizan las transformaciones en probit, logit o de Weibull están previstos para aplicarse a datos cuantales (por ejemplo, mortalidad o supervivencia), y que es necesario modificarlos para aplicarlos a datos de tasas de crecimiento o rendimiento. En las referencias (8), (9) y (10) pueden encontrarse métodos específicos de determinación de los valores de $EC_x$ a partir de datos continuos.

59. Respecto a cada variable de respuesta que haya de analizarse, se utilizará la relación concentración-respuesta para calcular estimaciones puntuales de los valores de $EC_x$. Cuando sea posible, se determinarán los límites de confianza del 95 % de cada estimación. La bondad del ajuste de los datos de respuesta al modelo de regresión se evaluará de forma gráfica o estadística. El análisis de regresión se efectuará utilizando las respuestas de las distintas réplicas y no los promedios de los grupos de tratamiento.

60. Las estimaciones de la $EC_{50}$ y los límites de confianza pueden obtenerse también utilizando la interpolación lineal con *bootstrapping* (10) si los métodos o modelos de regresión disponibles no son adecuados para los datos.

61. Para la estimación de los valores de LOEC y, por tanto, de NOEC, es necesario comparar los promedios de tratamiento utilizando técnicas de análisis de la varianza (ANOVA). A continuación se compara la media obtenida para cada concentración con la del testigo aplicando un método de comparación múltiple o de tendencia apropiado. Las pruebas de Dunnett o Williams pueden ser útiles (12) (13) (14) (15) (16). Hay que comprobar si se sostiene la hipótesis del ANOVA de homogeneidad de la varianza. Esta comprobación puede realizarse gráficamente o mediante una prueba en regla (15). Son adecuadas las pruebas de Levene o Bartlett. El incumplimiento de

▼M7

la hipótesis de homogeneidad de las varianzas puede corregirse a veces mediante la transformación logarítmica de los datos. Si la heterogeneidad de la varianza es extrema y no puede corregirse mediante transformación, ha de considerarse la posibilidad de efectuar un análisis por métodos como las pruebas de tendencia de Jonkheere de ajuste secuencial. En la referencia (10) puede encontrarse más información sobre la determinación de la NOEC.

62. Los recientes avances científicos han llevado a recomendar el abandono del concepto de NOEC para sustituirlo por el de estimaciones puntuales de $EC_x$ basadas en la regresión. Aún no se ha determinado un valor adecuado de x para esta prueba con *Myriophyllum*. Sin embargo, parece que es apropiado el intervalo del 10 al 20 % (según la variable de respuesta elegida) y lo mejor es indicar tanto la $EC_{10}$ como la $EC_{20}$ y sus límites de confianza.

**Presentación de informes**

63. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema*

Sustancias de un solo componente:

— naturaleza física, hidrosolubilidad y propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nomenclatura IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILE o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica (incluido el contenido de carbono orgánico, si procede).

Sustancias de componentes múltiples, sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos (UVCB) o mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el párrafo anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Especie de ensayo*

— nombre científico y procedencia.

*Condiciones del ensayo*

— procedimiento seguido (estático o semiestático);

— fecha de inicio y duración del ensayo;

— medio de ensayo;

— descripción del diseño experimental: recipientes de ensayo y sus tapas, volúmenes de solución, longitud del brote principal por recipiente de ensayo al inicio del ensayo;

— concentraciones de ensayo (nominales y medidas, según proceda) y número de réplicas por concentración;

— métodos de preparación de las soluciones madre y de ensayo, incluido el eventual uso de disolventes o dispersantes;

— temperatura durante el ensayo;

— fuente, intensidad y homogeneidad de la luz;

— valores de pH de los medios de ensayo y testigo;

— método de análisis del producto problema con datos adecuados de evaluación de la calidad (estudios de validación, desviaciones típicas o límites de confianza de los análisis);

▼M7

— métodos de determinación de la longitud del brote principal y otras variables de medición, como la longitud total de las ramas laterales, la longitud total de los brotes, la longitud total de las raíces, el peso fresco,el peso seco yel número de verticilos;

— estado del cultivo (estéril o no estéril) de cada recipiente de ensayo y testigo en cada observación;

— todas las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

*Resultados*

— datos en bruto: longitud del brote principal y otras variables de medición en cada recipiente de ensayo y testigo en cada observación y momento de análisis;

— medias y desviaciones típicas de cada variable de medición;

— curvas de crecimiento de cada variable de medición;

— variables de respuesta calculadas de cada réplica de tratamiento, con valores medios y coeficiente de variación de las réplicas;

— representación gráfica de la relación concentración-efecto;

— estimaciones de parámetros de la toxicidad correspondientes a variables de respuesta, por ejemplo, $EC_{50}$, $EC_{10}$, $EC_{20}$, e intervalos de confianza asociados; en caso de que se calculen la LOEC o la NOEC, se indicarán sus valores y los métodos estadísticos utilizados en su determinación;

— si se ha utilizado el ANOVA, el tamaño del efecto que puede observarse (por ejemplo, la diferencia significativa mínima);

— cualquier estimulación del crecimiento que se haya observado en cualquier recipiente de tratamiento;

— cualquier signo visual de fitotoxicidad, así como observaciones de las soluciones de ensayo;

— discusión de los resultados, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) ASTM Designation E 1913-04, Standard Guide for Conducting Static, Axenic, 14-Day Phytotoxicity Tests in Test Tubes with the Submersed Aquatic Macrophyte, *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

(1) Maletzki, D. *et al*. (2010), *Myriophyllum spicatum* als ökotoxikologischer Testorganismus: Methodenentwicklung eines sedimentfreien Testsystems und erste Ergebnisse mit 3,5-Dichlorphenol, *Umweltwiss Schadst Forsch,* No. 22, pp. 702–710.

(2) Capítulo C.26 del presente anexo, *Prueba de inhibición del crecimiento de Lemna sp.*

(3) OCDE (2014), «*Myriophyllum spicatum* Toxicity Test: Results of an inter-laboratory ring test using a sediment-free test system», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series Testing and Assessment, No. 205, OECD Publishing, Paris.

(4) OCDE (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(5) Capítulo C.51 del presente anexo, Ensayo de toxicidad agua-sedimento en *Myriophyllum spicatum*

▼**M7**

(6) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, *Environmental Science & Technology*, Vol. 18/9, 713-718.

(7) Nyholm, N. *et al*. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, *Environmental Toxicology and Chem*istry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(8) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11/10, pp. 1485-1494.

(9) OCDE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(10) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88, US EPA, Duluth, MN.

(11) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(12) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, *Biometrics*, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(13) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(14) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, *Biometrics*, Vol. 28/2, pp. 519-531.

(15) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, *Weed Research*, Vol. 29/2, pp. 93-96.

▼M7

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Biomasa**: el peso fresco/seco de materia viva presente en una población. En este ensayo, la biomasa es la suma del brote principal, todas las ramas laterales y todas las raíces.

**Producto**: sustancia o mezcla.

**Clorosis**: cambio de color del verde al amarillento del organismo de ensayo, especialmente de los verticilos.

**$EC_x$**: concentración del producto problema disuelto en el medio de ensayo que produce una reducción del x % (por ejemplo, del 50 %) en el crecimiento de *Myriophyllum spicatum* dentro de un plazo de exposición definido (que debe indicarse explícitamente si es distinto de la duración completa o normal del ensayo). Para expresar de forma inequívoca el valor de EC obtenido a partir de la tasa de crecimiento o del rendimiento, se usan respectivamente los símbolos» $E_rC$ «y» $E_yC$«, seguidos de la variable de medición que se ha utilizado, por ejemplo $E_rC$ (longitud del brote principal).

**Crecimiento**: aumento en la variable de medición, como la longitud del brote principal, longitud total de las ramas laterales, longitud total de los brotes, longitud total de las raíces, peso fresco, peso seco y número de verticilos durante el período de ensayo.

**Tasa de crecimiento** (tasa media de crecimiento específico): aumento logarítmico de la variable de medición durante el período de exposición. *Nota*: Las variables de respuesta relacionadas con la tasa de crecimiento son independientes de la duración del ensayo, siempre que el patrón de crecimiento de los organismos testigo no expuestos sea exponencial.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: concentración estudiada mínima a la que se observa que el producto ejerce un efecto estadísticamente significativo de reducción del crecimiento (con $p < 0,05$) cuando se compara con el testigo, dentro de un tiempo de exposición dado. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

**Variables de medición**: las variables de cualquier tipo que se miden para expresar el parámetro del ensayo utilizando una o más variables de respuesta diferentes. En este método de ensayo son variables de medición la longitud del brote principal, la longitud total de las ramas laterales, la longitud total de los brotes, la longitud total de las raíces, el peso fresco, el peso seco y el número de verticilos.

**Monocultivo**: cultivo con una sola especie vegetal.

**Necrosis**: tejido muerto (es decir, blanco o marrón oscuro) del organismo de ensayo.

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: concentración estudiada que se encuentra inmediatamente por debajo de la LOEC.

**Variable de respuesta**: variable para la estimación de la toxicidad derivada de cualquier variable medida que describa la biomasa por distintos métodos de cálculo. A efectos del presente método de ensayo, la tasa de crecimiento y el rendimiento son variables de respuesta derivadas de variables de medición como la longitud del brote principal, la longitud total de los brotes, el peso fresco, el peso seco o el número de verticilos.

**Ensayo semiestático (de renovación semiestática)**: ensayo en que, a lo largo de

▼M7

su duración, la solución problema se sustituye periódicamente, a intervalos específicos.

**Ensayo estático**: ensayo en que, a lo largo de su duración, no hay renovación de la solución problema.

**Producto problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Parámetro del ensayo**: factor general que, como objetivo del ensayo, es modificado por el producto problema respecto al control. En este método el parámetro del ensayo es la inhibición del crecimiento, que se puede expresar mediante diferentes variables de respuesta, basadas en una o más variables de medición.

**Medio de ensayo**: medio de cultivo sintético y completo en que crecen las plantas del ensayo cuando se exponen al producto problema. Este se disuelve en principio en el medio de ensayo.

**UVCB**: sustancia de composición desconocida o variable, producto complejo de reacción y material biológico.

**Rendimiento**: valor de una variable de medición para expresar la biomasa al final del período de exposición menos el valor de la variable de medición al inicio del período de exposición. Nota: Cuando el patrón de crecimiento de los organismos no expuestos sea exponencial, las variables de respuesta basadas en el rendimiento disminuirán con la duración del ensayo.

▼M7

*Apéndice 2*

**MEDIO DE ANDREWS MODIFICADO PARA EL CULTIVO MADRE Y EL PRECULTIVO**

El medio de Andrews modificado, requerido para el cultivo madre y el precultivo, se preparará a partir de cinco soluciones madre de nutrientes preparadas por separado y a las cuales se añadirá un 3 % de sacarosa.

*Cuadro 1*

**Composición de la solución de nutrientes de Andrews: (Norma ASTM E 1913-04)**

| Producción de las soluciones madre de nutrientes | | | Producción de la solución de nutrientes |
|---|---|---|---|
| Solución madre | Producto | Peso inicial por 1 000 ml | ml por 5 l de solución de nutrientes |
| 1 | KCl | 74,6 mg | 50 |
| | $KNO_3$ | 8,08 g | |
| | $Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$ | 18,88 g | |
| 2 | $MgSO_4 \times 7\ H_2O$ | 9,86 g | 50 |
| 3 | Véase la solución madre n.º 3.1 a continuación | | 50 |
| 4 | $KH_2PO_4$ | 2,72 g | 50 |
| 5 | $FeSO_4 \times 7\ H_2O$ | 0,278 g | 50 |
| | $Na_2EDTA \times 2\ H_2O$ | 0,372 g | |

Las soluciones madre se pueden mantener en un refrigerador durante 6 meses (a 5-10 ºC). Solo la solución madre n.º 5 tiene una vida útil reducida (dos meses).

*Cuadro 2*

**Producción de la solución madre n.º 3.1 para preparar la solución madre n.º 3**

| Producto | Peso inicial g/100 ml |
|---|---|
| $MnSO_4 \times 4\ H_2O$ | 0,223 |
| $ZnSO_4 \times 7\ H_2O$ | 0,115 |
| $H_3BO_3$ | 0,155 |
| $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ | 0,0125 |
| $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4\ H_2O$ | 0,0037 |

Después de haber preparado la solución madre n.º 3.1 (cuadro 2), congele esta solución en porciones de 11 ml aproximadamente (a -18 ºC como mínimo). La vida útil de estas porciones congeladas es de cinco años.

Para producir la solución madre n.º 3, descongele la solución madre n.º 3.1, vierta 10 ml de dicha solución en un matraz aforado de 1 l y añada agua ultrapura hasta la marca del matraz.

Para obtener el medio de Andrews modificado, ponga aproximadamente 2 500 l de agua ultra pura en un matraz aforado de 5 l. Después de añadir 50 ml de cada solución madre, llene el 90 % del matraz aforado con agua ultrapura y ajuste el pH a 5.8.

▼M7

A continuación, añada 150 g de sacarosa disuelta (3 % por 5 l); luego, llene el matraz aforado con agua ultra pura hasta la marca. Por último, vierta la solución nutritiva en matraces Schott de 1 l y esterilícelos en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

La solución nutritiva que se obtiene así se puede conservar estéril en un refrigerador (entre 5 y 10 °C) durante tres meses.

**Medio de Andrews modificado para el ensayo de toxicidad sin sedimentos**

El medio de Andrews modificado concentrado diez veces, necesario para obtener las soluciones de ensayo, se prepara a partir de las cinco soluciones madre nutritivas ya mencionadas en los cuadros 1 y 2, a las que se les añade un 30 % de sacarosa. Para ello, ponga aproximadamente 100 ml de agua ultra pura en un matraz aforado de 1 l. Añada 100 ml de cada solución madre y ajuste el pH a 5,8. A continuación, añada un 30 % de sacarosa disuelta (300 g por 1 000 ml) y llene el matraz aforado con agua ultrapura hasta llegar a la marca.

Por último, vierta la solución de nutrientes en matraces Schott de 0,5 l y esterilícelos en un autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

La solución de nutrientes modificada concentrada diez veces que se obtiene así se puede conservar estéril en un refrigerador (entre 5 y 10 °C) durante tres meses.

▼M7

*Apéndice 3*

**MANTENIMIENTO DEL CULTIVO MADRE**

En el presente apéndice 3 se describe el cultivo madre de *Myriophyllum spicatum* L. ([1]), una especie de planta acuática sumergida dicotiledónea del grupo de las milenrama. Entre junio y agosto produce discretas flores de color rosa y blanco que sobresalen por encima de la superficie del agua. Las plantas enraízan en el suelo mediante un sistema de rizomas robustos y pueden encontrarse en todo el hemisferio norte en aguas eutróficas, (pero no contaminadas) estancadas, muy calcáreas, con sustrato fangoso. *Myriophyllum spicatum* prefiere el agua dulce, pero también se encuentra en aguas salobres.

Para un cultivo madre sin sedimentos en condiciones de laboratorio se requieren plantas estériles. Las plantas estériles están disponibles en el laboratorio de ecotoxicología de la Umweltbundesamt alemana (Agencia Federal Alemana de Medio Ambiente).

También es posible preparar los organismos de ensayo a partir de plantas no estériles según la norma ASTM E 1913-04. A continuación se presenta un extracto de la guía de la norma ASTM que indica el procedimiento de cultivo de ejemplares de *Myriophyllum sibiricum* obtenidos de la naturaleza:

> «Si optamos por plantas no estériles obtenidas de la naturaleza, hay que recoger turiones de *M. sibiricum* en el otoño. Los turiones deben colocarse en un acuario de 20 l que contenga 5 cm de sedimento estéril recubierto de arena de sílice o, por ejemplo de Turface® y 18 l de agua de grado reactivo. Airear el acuario y mantenerlo a una temperatura de 15 $^{o}$C, así como a un caudal de entre 200 y 300 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ durante 16 horas al día. El cultivo de las plantas en el acuario puede proporcionar plantas de repuesto en caso de que los cultivos estériles se destruyan por un mal funcionamiento mecánico del recipiente de cultivo, contaminación u otro motivo. Las plantas cultivadas en el acuario no son estériles y los cultivos estériles no pueden conservarse en un sistema de cultivo en lotes. Para esterilizar el cultivo, hay que retirar las plantas del acuario y enjuagarlas bajo una corriente de agua desionizada durante media hora aproximadamente. A continuación, se desinfectan en condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar durante 20 minutos como máximo (hasta que la mayoría del tejido vegetal se haya blanqueado y solo quede de color verde el ápice en crecimiento) en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % (p/v) que contenga 0,01 % de un tensoactivo adecuado. Agitar el desinfectante y el material vegetal. Se transfieren los segmentos con varios nodos a tubos de cultivo estériles con 45 ml de medio de Andrews modificado esterilizado y se tapan con cierres de tubo de cultivo corrientes. Solo se coloca un segmento vegetal por recipiente de ensayo. Para garantizar que los recipientes de cultivo están bien cerrados, se sellan con lámina adhesiva de laboratorio. Cuando se ha establecido un cultivo estéril, deben transferirse segmentos vegetales con varios nodos a recipientes de ensayo nuevos que contengan medio nutritivo líquido que debe prepararse de nuevo cada diez o doce días. Como se habrá demostrado mediante cultivos en placas de agar, las plantas deben estar estériles y mantenerse estériles durante ocho semanas antes de iniciar el ensayo».

Dado que el medio modificado de Andrews contiene sacarosa (que estimula el crecimiento de hongos y bacterias), todos los materiales, soluciones y cultivos deben prepararse en condiciones estériles. Todos los líquidos y el equipo deben esterilizarse antes de su uso. Dicha esterilización se lleva a cabo mediante tratamiento con aire caliente (210 $^{o}$C) durante 4 horas o en autoclave a 121 $^{o}$C durante 20 minutos. Además, todos los matraces, placas, cubetas y el resto del equipo deben someterse a flameado en una campana estéril antes de su uso.

Los cultivos madre pueden mantenerse en condiciones de iluminación reducida y a temperaturas bajas (50 μE $m^{-2}$ $s^{-1}$, 20 ± 2 $^{o}$C) durante tiempos prolongados sin tener que volver a establecerlos de nuevo. El medio de cultivo de *Myriophyllum* debe ser

([1]) Carl von Linné (* 23 de mayo de 1707, Råshult /Älmhult; † 10 de enero de 1778, Uppsala).

▼M7

el mismo que se utilice en los ensayos, pero también pueden utilizarse otros medios ricos en nutrientes para los cultivos madre.

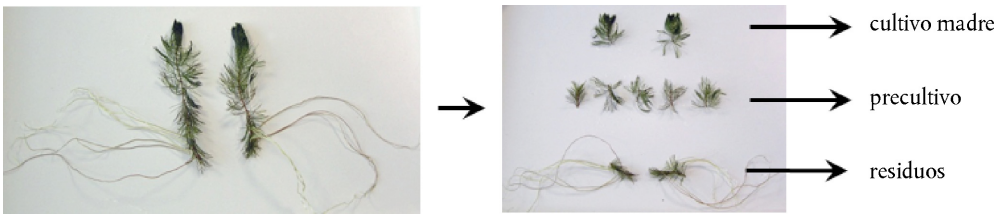
Los segmentos vegetales se distribuyen en condiciones axénicas en varios matraces Erlenmeyer de 500 ml o Fernbach de 2 000 ml, cada uno respectivamente con unos 450 ml o 1 000 ml de medio de Andrews modificado. Los matraces se cerrarán en condiciones axénicas con tapones de celulosa.

Además, es obligatorio someter el equipo a flameado en una campana de laboratorio estéril justo antes de su uso. En función del número y el tamaño, las plantas se transferirán a la solución nutritiva recién preparada aproximadamente cada tres semanas.

Para este cultivo renovado se pueden utilizar ápices o segmentos de la parte central del tallo. El número y el tamaño de las plantas transferidas (o de los segmentos de plantas) dependen del número de plantas necesario. Por ejemplo, pueden transferirse cinco segmentos de brotes a un matraz Fernbach y tres segmentos de brotes a un matraz Erlenmeyer, cada uno con una longitud de 5 cm. Hay que eliminar los segmentos que presenten raíces, flores, zonas muertas u otras partes que llamen la atención.

*Figura 1*

**Corte de las plantas para el cultivo madre y el precultivo tras tres semanas de cultivo.**




Las plantas se cultivan en los matraces Erlenmeyer de 500 ml y Fernbach de 2 000 ml en una incubadora de refrigeración a 20 ± 2 °C y con una iluminación continua de aproximadamente 100-150 µE $m^{-2}$ $s^{-1}$ o 6 000-9 000 Lux (emitida por iluminación de la cámara con una temperatura de color correspondiente a «luz blanca cálida»).

*Figura 2*

**Cultivo de las plantas en una incubadora de refrigeración con iluminación de la cámara.**



Para los cultivos deben utilizarse recipientes estériles de vidrio, químicamente limpios (lavados con ácido); su manipulación se hará asépticamente. En caso de contaminación del cultivo madre, por ejemplo mediante algas, hongos o bacterias, habrá que preparar un nuevo cultivo o utilizar un cultivo madre de otro laboratorio para renovar el cultivo en cuestión.

▼M7

*Apéndice 4*

**MANTENIMIENTO DEL PRECULTIVO Y PREPARACIÓN DEL ORGANISMO DE ENSAYO PARA EL ENSAYO**

Para obtener un precultivo, hay que cortar los brotes del cultivo madre en segmentos con dos verticilos cada uno. Los segmentos se colocarán en matraces Fernbach con medio de Andrews modificado (con un 3 % de sacarosa). Cada matraz puede contener hasta 50 segmentos de brotes. Hay que asegurarse, no obstante, de que los segmentos están vivos y no tienen raíces, ramas laterales ni yemas (véase la figura 1 del apéndice 3).

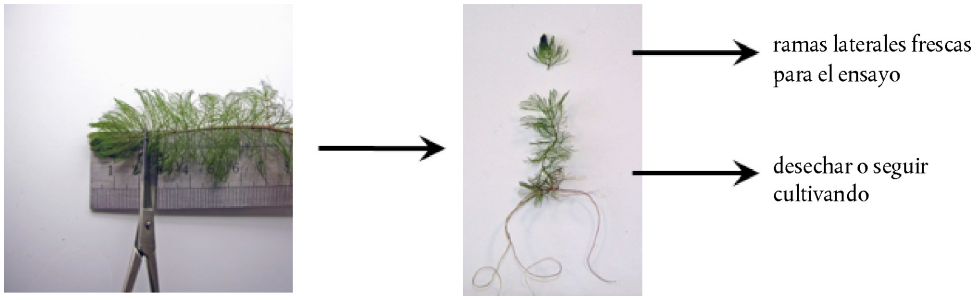
Los organismos de precultivo se cultivan entre 14 y 21 días en condiciones estériles en una cámara ambiental, alternando 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La intensidad luminosa debe estar comprendida entre 100-150 µE $m^{-2}$ $s^{-1}$. La temperatura de los recipientes de ensayo debe ser de 23 ± 2 °C.

Dado que el medio modificado de Andrews contiene sacarosa (que estimula el crecimiento de algas, hongos y bacterias), las soluciones del producto problema deben prepararse y los cultivos deben realizarse en condiciones estériles. Todos los líquidos y el equipo deben esterilizarse antes de su uso. Dicha esterilización se lleva a cabo mediante tratamiento con aire caliente (210 °C) durante 4 horas o en autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Además, todos los matraces, placas, cubetas y el resto del equipo deben someterse a flameado en una campana estéril antes de su uso.

Hay que retirar los brotes de los matraces de precultivo en condiciones axénicas, seleccionando el material que sea lo más homogéneo posible. Cada ensayo requiere como mínimo 60 organismos de ensayo (ensayo con ocho concentraciones del producto problema). Para llevar a cabo el ensayo, hay que tomar las ramas laterales frescas de los precultivos, cortarlas a 2,5 cm de la base (se mide con una regla) y transferirlas a un vaso con medio modificado de Andrews estéril. Estas ramas laterales frescas pueden utilizarse para el ensayo de toxicidad sin sedimentos en *Myriophyllum spicatum*.

*Figura 2*

**Corte de las plantas del precultivo para el ensayo de toxicidad sin sedimentos en *Myriophyllum spicatum*.**



▼M7

## C.51. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUA-SEDIMENTO EN *MYRIOPHYLLUM SPICATUM*

INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo de la OCDE TG 239 (2014). Hay métodos de ensayo disponibles para plantas acuáticas monocotiledóneas flotantes de especies de *Lemna* (1) y para especies de algas (2). Estos métodos se usan normalmente para generar datos que permitan analizar el riesgo de productos problema, principalmente de los que tienen actividad herbicida, para especies de plantas acuáticas no diana. No obstante, en algunos casos se requieren datos para otras especies de macrófitos. Un documento de orientación publicado recientemente por el taller de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental (SETAC) sobre la evaluación de los riesgos asociados a plaguicidas para los macrófitos acuáticos (Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, AMRAP) sugiere que se requieran datos acerca de los efectos sobre especies de macrófitos enraizados en caso de productos problema cuyo modo de acción se sabe que no afecta a *Lemna* ni a algas o cuyo reparto en el sedimento es preocupante por favorecer el riesgo de absorción radicular (3). Según los conocimientos actuales y la experiencia adquirida, se han seleccionado especies pertenecientes al género *Myriophyllum* como las especies preferidas cuando se requieren datos para especies dicotiledóneas enraizadas sumergidas (4) (5) (6). El presente ensayo no sustituye a otros ensayos de toxicidad acuática, sino que los complementa para permitir una evaluación más completa de los peligros y riesgos para la flora acuática. El método de ensayo agua-sedimento en *Myriophyllum spicatum* complementa al ensayo de toxicidad sin sedimentos en *Myriophyllum spicatum* (7).

2. El presente documento describe un método de ensayo que permite evaluar los efectos de un producto problema en la especie de planta acuática enraizada *Myriophyllum spicatum* cultivada en un sistema agua-sedimento. Este método se basa parcialmente en métodos existentes (1) (2) (8) y tiene en cuenta las últimas investigaciones relacionadas con la evaluación de riesgos en plantas acuáticas (3). El método agua-sedimento ha sido validado por un ensayo interlaboratorios internacional llevado a cabo con especies de *Myriophyllum* cultivadas en condiciones estáticas y expuestas al producto problema a través de la columna de agua (9). Este sistema de ensayo, no obstante, es fácil de adaptar para permitir una exposición a través del sedimento enriquecido o de la fase acuosa en escenarios semiestáticos o de dosis repetidas, aunque dichos escenarios no se hayan estudiado formalmente en un ensayo interlaboratorios. Además, el método general puede utilizarse para otras especies enraizadas sumergidas y emergentes, incluidas otras especies de *Myriophyllum* (p.ej., *Myriophyllum aquaticum*) y *Glyceria maxima* (10). Puede que sea necesario modificar las condiciones, el diseño o la duración del ensayo para otras especies. En particular, se requieren más investigaciones para definir los procedimientos adecuados para *Myriophyllum aquaticum*. Estas opciones no se presentan en detalle en este método, que describe el enfoque estándar para la exposición de *Myriophyllum spicatum* en un sistema estático a través de la fase acuosa.

3. El presente método de ensayo se aplica a sustancias, para las que el ensayo se ha validado [véase más información en el informe del ensayo interlaboratorios (9)], a formulaciones o a mezclas conocidas. Puede realizarse un ensayo en *Myriophyllum* para responder a la necesidad de datos de nivel uno provocada por el posible reparto del producto problema en el sedimento o por cuestiones relativas al modo de acción o la selectividad. Igualmente, puede que se requiera un ensayo en *Myriophyllum* realizado en laboratorio como parte de una estrategia de nivel superior para abordar las preocupaciones sobre los riesgos para las plantas acuáticas. El motivo concreto para llevar a cabo el ensayo determinará la vía de exposición (a través del agua o del sedimento). Antes de utilizar el método de ensayo con fines normativos en una mezcla hay que considerar si proporcionará resultados adecuados para la finalidad reglamentaria en cuestión y, en caso de que sea así, por qué. Dichas consideraciones no son necesarias cuando los requisitos reglamentarios estipulan que la mezcla debe someterse a ensayo.

▼M7

PRINCIPIO DEL ENSAYO

4. El ensayo está diseñado para evaluar los efectos de los productos sobre el crecimiento vegetativo de las plantas de *Myriophyllum* cultivadas en medios normalizados (agua, sedimento y nutrientes). Se plantan ápices de brotes de plantas sanas y sin flores en un sedimento artificial normalizados, que se complementa con nutrientes adicionales para garantizar un crecimiento adecuado de la planta; a continuación, se mantienen en medio de Smart y Barko (apéndice 1). Después de un período de implantación para permitir la formación de raíces, las plantas se exponen a una serie de concentraciones de ensayo añadidas a la columna de agua. Además, también es posible simular la exposición a través del sedimento si se añade el producto problema al sedimento artificial y las plantas se trasplantan a este sedimento enriquecido. En ambos casos, las plantas se mantienen posteriormente en condiciones ambientales controladas durante 14 días. Los efectos sobre el crecimiento se determinan a partir de evaluaciones cuantitativas de la longitud de los brotes, el peso fresco y el peso seco, así como observaciones cualitativas de síntomas como clorosis, necrosis o anomalías de crecimiento.

5. Para cuantificar los efectos del producto, se compara el crecimiento en las soluciones de ensayo con el de las plantas testigo y se determina la concentración que ocasiona una inhibición del crecimiento de un porcentaje especificado, la cual se expresa como $EC_x$; «x» puede ser cualquier valor estipulado por las imposiciones normativas (por ejemplo, $EC_{10}$, $EC_{20}$ y $EC_{50}$). Hay que tener en cuenta que las estimaciones de los valores de la $EC_{10}$ y $EC_{20}$ solo son fiables y apropiados en ensayos donde los coeficientes de variación para las plantas testigo son inferiores al nivel de efecto que se está estimando; es decir, los coeficientes de variación deben ser inferiores al 20 % para calcular de forma sólida la $EC_{20}$.

6. Se debe determinar tanto la tasa media de crecimiento específico (calculada a partir de la longitud de los brotes, el peso fresco de los brotes y el peso seco de los brotes) como el rendimiento (calculado a partir del crecimiento de la longitud de los brotes, el peso fresco de los brotes y el peso seco de los brotes) de las plantas tratadas y sin tratar. La tasa de crecimiento específico (r) y el rendimiento (y) se usan posteriormente para determinar la $E_rC_x$ (p. ej., $E_rC_{10}$, $E_rC_{20}$, $E_rC_{50}$) y $E_yC_x$ (p. ej., $E_yC_{10}$, $E_yC_{20}$, $E_yC_{50}$) respectivamente.

7. Si es necesario, pueden determinarse estadísticamente la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y la concentración sin efecto observado (NOEC) a partir de las estimaciones de las tasas medias de crecimiento específico y el rendimiento.

INFORMACIÓN SOBRE EL PRODUCTO PROBLEMA

8. Debe contarse con un método analítico que tenga la sensibilidad adecuada para cuantificar los productos en el medio de ensayo.

9. Entre la información sobre el producto problema que puede ser útil para establecer las condiciones del ensayo se encuentran los siguientes datos: fórmula estructural, composición en el caso de sustancias de componentes múltiples, UVCB, mezclas o fórmulas, pureza, hidrosolubilidad, estabilidad en el agua y a la luz, constante de disociación ácida ($pK_a$), coeficiente de reparto octanol/agua ($K_{ow}$), $K_d$ a sedimentos (si está disponible), presión de vapor y biodegradabilidad. La hidrosolubilidad y la presión de vapor pueden utilizarse para calcular la constante de la ley de Henry, que indicará la probabilidad de la pérdida de cantidades significativas de producto problema durante el tiempo del ensayo. Si es probable que se produzcan pérdidas de los productos problema, dichas pérdidas deberán cuantificarse y habrá que documentar las medidas tomadas para controlarlas. Cuando sea dudosa la información sobre la solubilidad y estabilidad de los productos problema, se recomienda que se evalúen dichas propiedades en las condiciones del ensayo, es decir, con el medio de cultivo, la temperatura y el régimen de iluminación que se vayan a utilizar en el ensayo. Nota: Cuando el ensayo se lleve a cabo con herbicidas peroxidantes dependientes de la luz, la iluminación del laboratorio deberá contener la presencia equivalente de luz ultravioleta solar encontrada en la luz natural del sol.

▼M7

10. El pH del medio de ensayo se medirá y ajustará según proceda. El control del pH del medio de ensayo es particularmente importante, por ejemplo cuando se estudien metales o productos hidrolíticamente inestables. Se ofrece más orientación sobre los ensayos de productos con propiedades fisicoquímicas que dificultan estos ensayos en el documento de orientación de la OCDE (11).

VALIDEZ DEL ENSAYO

11. Para que los resultados del ensayo sean válidos, la longitud media total de los brotes y el peso fresco medio total de los brotes de las plantas testigo deberá duplicarse, como mínimo, durante la fase de exposición del ensayo. Por otro lado, las plantas testigo no deben presentar síntomas visibles de clorosis ni debe haber signos evidentes de contaminación por otros organismos, como algas o biopelículas, en las plantas, la superficie del sedimento ni el medio de ensayo.

12. En los cultivos testigo, el coeficiente medio de variación del rendimiento basado en las mediciones del peso fresco de los brotes (es decir, desde el inicio del ensayo hasta el fin del ensayo) no debe superar el 35 % entre réplicas.

PRODUCTO DE REFERENCIA

13. Para comprobar cómo funciona el procedimiento de ensayo con el tiempo, deben someterse periódicamente a ensayo uno o varios productos de referencia, como el 3,5-diclorofenol utilizado en el ensayo interlaboratorios (9). En el ensayo interlaboratorios, los valores medios de la $EC_{50}$ del 3,5-DCP para las diferentes variables de respuesta estudiadas se encontraban entre 4,7 y 6,1 mg/l (véase el informe del ensayo interlaboratorios para obtener más información sobre los intervalos de confianza anticipados asociados a estos valores). Se recomienda efectuar un ensayo con un producto de referencia al menos dos veces al año o, si la frecuencia de los ensayos es baja, en paralelo con los ensayos de toxicidad definitiva. El informe estadístico del ensayo interlaboratorios internacional (9) contiene una guía que indica los valores de la $EC_{50}$ que se esperan para el 3,5-DCP.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipos de ensayo**

14. El ensayo debe realizarse en condiciones ambientales controladas, es decir, en una cámara o recinto de cultivo o en un laboratorio, con una longitud del dia, iluminación y temperatura que se puedan controlar (véase la sección «Condiciones del ensayo», puntos 56-58). Los cultivos madre se deben conservar aparte de los recipientes de ensayo.

15. El presente estudio debe realizarse empleando recipientes de ensayo de vidrio, como acuarios o vasos; se suelen utilizar vasos de vidrio de 2 l (aproximadamente de 24 cm de altura y 11 cm de diámetro). Pueden utilizarse, no obstante, otros recipientes (más grandes), siempre que tengan una profundidad de agua suficiente para permitir el crecimiento ilimitado y mantener las plantas sumergidas durante toda la duración del ensayo.

16. Pueden utilizarse macetas para plantas de plástico o vidrio (aproximadamente de 9 cm de diámetro, 8 cm de altura y 500 mm de volumen) como recipientes para plantar el material vegetal en el sedimento. Además, se pueden utilizar vasos de vidrio y en algunos casos se prefiere su uso (como para realizar ensayos en productos hidrófobos o productos con un alto $K_{ow}$).

17. El tamaño del vaso/maceta dependerá de los recipientes de ensayo y del diseño de ensayo preferido (véase a continuación). Para el diseño de ensayo A (un brote por maceta con tres macetas por recipiente) se pueden necesitar macetas más pequeñas o recipientes más grandes. Para el diseño de ensayo B (tres brotes por maceta y una maceta por recipiente) los tamaños de maceta y recipientes indicados deben ser adecuados. En todos los casos, el sedimento debe estar recubierto como mínimo con 12 cm de agua y se debe determinar la relación entre superficie/volumen de sedimento y superficie/volumen de agua.

▼M7

**Organismo de ensayo**

18. Los enfoques generales descritos en este método de ensayo pueden adoptarse para someter a ensayo distintas especies de plantas acuáticas. No obstante, las condiciones definidas en el presente método de ensayo se han establecido para una especie concreta de milenrama acuática, *Myriophyllum spicatum*. Esta especie pertenece a la familia dicotiledonia, las Haloragaceae.

19. *Myriophyllum spicatum* (milenrama acuática euroasiática) es una especie enraizada sumergida, que tolera una amplia gama de condiciones y se encuentra tanto en masas de aguas quietas como corrientes. *M. spicatum* es una planta perenne de la que mueren durante el invierno todas las partes distintas de las raices. En general florece y produce semillas en abundancia, aunque la propagación vegetativa a partir de las yemas axilares o fragmentos de tallo que se desprenden naturalmente o después de una perturbación suele ser el principal método de colonización.

*Cultivo del organismo de ensayo*

20. El material vegetal puede obtenerse de poblaciones naturales o de proveedores de plantas acuáticas. En ambos casos conviene documentar la fuente de las plantas y verificar la especie. Hay que tener sumo cuidado para garantizar que se recoge la especie correcta, *Myriophyllum spicatum,* de la naturaleza, especialmente en aquellas regiones donde puede haber híbridos con otras especies de *Myriophyllum*. En caso de duda se recomienda utilizar cultivos de laboratorio que se hayan verificado y que sean de fuentes conocidas. Se evitará utilizar las especies que se hayan expuesto a contaminantes químicos o recogidas de lugares que se saben que están contaminados.

21. En las zonas donde *M. spicatum* no está fácilmente disponible durante los meses de invierno, puede ser necesario mantenerlo a largo plazo cultivos madre en un invernadero o laboratorio. Los cultivos madre deben mantenerse en condiciones similares a las del ensayo, aunque la irradiancia y la temperatura pueden reducirse con el fin de limitar la frecuencia de las tareas de mantenimiento del cultivo (p. ej., cuando no está planificado durante un tiempo ningún ensayo con *Myriophyllum*). Se recomienda utilizar macetas de plantas o acuarios de mayor tamaño que los que se utilizarían en los ensayos a fin de que las plantas tengan espacio suficiente para proliferar. La composición del sedimento y de los medios acuáticos debe ser la misma que la de los ensayos; no obstante, pueden adoptarse métodos alternativos de fertilización del sedimento (p. ej., uso de formulaciones de fertilizantes comerciales de liberación lenta).

22. Los cultivos madre no deben presentar ningún signo visible de contaminación con otros organismos, como caracoles, algas filamentosas, hongos e insectos (como huevos o larvas de la polilla *Paraponyx stratiotata* y larvas o adultos del curculiónido *Eubrychius velutus*). Para eliminar la contaminación visible, puede ser necesario el material vegetal con agua dulce. Además, se realizarán los esfuerzos necesarios para minimizar el desarrollo de algas unicelulares y la contaminación bacteriana, incluso si no es impresindible que el material vegetal sea completamente estéril. Los cultivos madre deben supervisarse y transplantarse según sea necesario para evitar el desarrollo de algas y la contaminación bacteriana. Si la contaminación por bacterias o algas se convierte en un problema, puede resultar útil airear los cultivos madre.

23. En cualquier caso, las plantas se cultivan o aclimatan en condiciones similares (aunque no forzosamente idénticas) a las del ensayo durante un período adecuado (esto es, superior a dos semanas) antes de su uso en un ensayo.

24. Los cultivos madre que florezcan no se utilizarán para el ensayo, ya que las tasas de crecimiento vegetativo suelen disminuir por lo general durante la floración y después de esta.

▼M7

**Sedimento**

25. Se recomienda utilizar en este ensayo el siguiente sedimento formulado, basado en el sedimento artificial empleado en el capítulo C.28 del presente anexo (8). El sedimento se prepara como se describe en el ME C.28, salvo por la adición de nutrientes que se describe a continuación:

(a) 4-5 % de turba (peso seco, para 2 ± 0,5 % carbono orgánico) con un pH lo más cercano posible a 5,5-6,0; es importante utilizar turba en forma de polvo, finamente molida (tamaño de partícula preferido superior a1 mm) y secada solo al aire;

(b) 20 % de caolín (peso seco), con un contenido de caolinita preferentemente superior al 30 %;

(c) 75-76 % de arena de cuarzo (peso seco); debe predominar la arena fina, con más del 50 % de las partículas de un tamaño entre 50 y 200 μm;

(d) medio nutritivo acuoso añadido de forma que el lote de sedimento final contenga 200 mg tanto de cloruro amónico como de fosfato de sodio por kilogramo de sedimento seco y el contenido de humedad de la mezcla final se encuentre en el 30-50 %;

(e) carbonato de calcio de calidad químicamente pura ($CaCO_3$) añadido para ajustar el pH de la mezcla final del sedimento a 7,0 ± 0,5.

26. Debe conocerse y documentarse el origen de la turba, del caolín y de la arena. Si el origen es desconocido o suscita preocupación, hay que comprobar que el componente correspondiente está libre de contaminación química (p. ej., metales pesados, compuestos organoclorados, compuestos organofosforosos).

27. Hay que mezclar los componentes secos del sedimento de forma homogénea antes de incorporar uniformemente la solución nutritiva acuosa al sedimento. El sedimento húmedo debe prepararse al menos dos días antes de su uso para que la turba esté completamente embebida y para evitar que haya partículas de turba hidrófobas flotando por la superficie cuando el sedimento quede recubierto por el medio; antes de su uso, el sedimento húmedo debe guardarse en la oscuridad.

28. Para el ensayo, el sedimento se transfiere a envases del tamaño adecuado, como macetas de plantas de un diámetro que quepa en los recipientes de vidrio (la superficie del sedimento debe cubrir aproximadamente el 70 % como mínimo de la superficie del recipiente). Si el recipiente tiene orificios en el fondo, se puede colocar un trozo de filtro para evitar que salga sedimento del recipiente. El sedimento debe verterse en las macetas de forma que su superficie quede plana; a continuación, se recubre de una fina capa (de unos 2-3 mm) de un material inerte como arena, granilla hortícola fina (o coral triturado) para mantener el sedimento en su lugar.

**Medio de ensayo**

29. Se aconseja emplear el medio de Smart y Barko (12) para cultivar *Myriophyllum spicatum* y someterla a ensayo. La preparación de este medio se describe en el apéndice 1. Al principio del ensayo, el pH del medio (fase acuosa) debe estar entre 7,5 y 8,0 para garantizar un crecimiento óptimo de la planta.

**Diseño experimental**

30. El ensayo debe incluir como mínimo seis recipientes de ensayo replicados para el testigo sin tratar y un mínimo de cuatro recipientes de ensayo replicados para cada nivel de concentración (debe haber como mínimo cinco niveles de concentración).

31. Si no es necesario determinar la NOEC, el diseño del ensayo puede modificarse para aumentar el número de concentraciones y reducir el número de réplicas por concentración.

▼M7

32. Cada recipiente de ensayo representa una réplica que contiene tres brotes. Hay dos opciones para cultivar tres brotes en cada recipiente de ensayo:

— Diseño de ensayo A: un brote por maceta con tres macetas por recipiente.

— Diseño de ensayo B: tres brotes por maceta y una maceta por recipiente.

— Son aceptables otros diseños consistentes en un brote por maceta y por recipiente de ensayo, siempre y cuando se ajuste el número de réplicas para satisfacer los criterios de validez requeridos.

33. Cada recipiente de ensayo debe asignarse a un grupo de tratamiento de forma aleatoria. Es necesario un diseño aleatorizado de la distribución de los recipientes de ensayo en la zona de ensayo para minimizar la influencia de las diferencias espaciales de intensidad luminosa o temperatura.

**Concentraciones del producto problema y grupos testigo**

34. Las concentraciones deben seguir por lo general una progresión geométrica. La razón entre las concentraciones de ensayo no debe ser superior a 3,2. Para seleccionar las concentraciones de ensayo adecuadas es útil disponer de datos anteriores sobre la toxicidad del producto problema procedentes de un ensayo de determinación del intervalo.

35. Para determinar una $EC_x$, es necesario que las concentraciones de ensayo abarquen el valor de $EC_x$ a fin de asegurar un nivel adecuado de confianza. Por ejemplo, si se estima la $EC_{50}$, la mayor concentración de ensayo debe ser superior al valor de $EC_{50}$. Si el valor de $EC_{50}$ se encuentra fuera del intervalo de las concentraciones de ensayo, los intervalos de confianza asociados serán amplios y quizá no sea posible efectuar una evaluación adecuada del ajuste estadístico del modelo. El uso de más concentraciones de ensayo mejorará el intervalo de confianza del valor $EC_x$ que se obtiene.

36. Para determinar la LOEC/NOEC (parámetro opcional), la concentración de ensayo mínima debe ser lo suficientemente baja para que el crecimiento no difiera significativamente del crecimiento de las plantas testigo. Por otra parte, la mayor concentración de ensayo debe ser lo bastante alta para que el crecimiento correspondiente sea significativamente inferior al del testigo. Un mayor número de réplicas aumentará la potencia estadística del diseño basado en la concentración sin efecto/ANOVA.

**Ensayo límite**

37. En los casos en los que un ensayo de determinación del intervalo indica que el producto problema no tiene efectos adversos a concentraciones de hasta 100 mg/l, o hasta su límite de solubilidad en el medio de ensayo, o, en el caso de una formulación hasta su límite de dispersión, puede efectuarse un ensayo límite para facilitar la comparación de las respuestas de un grupo testigo y de un único grupo de tratamiento (100 mg/l o una concentración igual al límite de solubilidad o 1 000 mg/kg de sedimento seco). Este ensayo debe seguir los principios generales de un ensayo de dosis-respuesta estándar, a excepción de que se aconseja aumentar el número mínimo de réplicas a seis recipientes experimentales por testigo y por concentración. El crecimiento en el grupo testigo y en el de tratamiento puede analizarse mediante un método estadístico para comparar las medias como, por ejemplo, una prueba t de Student.

**Soluciones de ensayo**

38. Las soluciones de ensayo se preparan normalmente diluyendo una solución madre, obtenida disolviendo o dispersando el producto problema en un medio de Smart y Barko, usando agua desmineralizada (es decir, destilada o desionizada) (véase el apéndice 1).

▼M7

39. La mayor concentración de ensayo no debe superar como norma la hidrosolubilidad del producto problema o, en el caso de las fórmulas, el límite de dispersión en las condiciones de ensayo.

40. En el caso de productos problema de escasa hidrosolubilidad, puede ser necesario preparar una dispersión o solución madre concentrada del producto con un dispersante o disolvente orgánico para facilitar la adición de cantidades exactas del producto problema al medio de ensayo y ayudar a su dispersión y disolución. No obstante, debe evitarse en la mayor medida posible el empleo de tales disolventes o dispersantes, el cual no debe provocar fitotoxicidad. Por ejemplo, entre los disolventes utilizados frecuentemente que no causan fitotoxicidad a concentraciones de hasta 100 µl/l figuran la acetona y la dimetilformamida. Si se utiliza un disolvente o dispersante, su concentración final se indicará en el informe y se mantendrá a un nivel mínimo (≤ 100 µl/l). En estas circunstancias todos los testigo (de disolventes) y tratamientos contendrán la misma concentración de disolvente o dispersante. El ensayo debe incluir además réplicas de testigo sin tratar que no contengan disolvente ni dispersante. En un documento de orientación de la OCDE (11) se da más información sobre el uso de dispersantes.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

41. El procedimiento de ensayo varía en función de la vía de aplicación del producto problema (es decir, a través de la fase acuosa o de la fase sedimentaria). Hay que tener en cuenta el posible comportamiento del producto problema en un sistema agua-sedimento a la hora de elegir el régimen de exposición utilizado en el ensayo (esto es, estático o renovación estática, agua enriquecida o sedimento enriquecido). Los ensayos con sedimento enriquecido pueden preferirse a veces cuando se prevea que los productos se distribuirán significativamente en el sedimento.

**Fase de implantación**

42. Los ápices o las puntas del brote sanos (sin brotes laterales) se cortan de las plantas de cultivo para que la longitud del brote sea de 6 cm (± 1 cm). Para el diseño de ensayo A (un brote por maceta con tres macetas por recipiente), se planta una única punta de brote en cada maceta. Para el diseño de ensayo B (tres brotes por maceta y una maceta por recipiente), se plantan entre cuatro y cinco ápices de brote en cada maceta que contiene sedimento.

43. En ambos casos, se deben plantar macetas de sobra para permitir una selección de plantas uniformes al inicio de ensayo, así como para tener plantas de reserva que sirvan para inspeccionar el crecimiento de las raíces justo antes del tratamiento o que puedan recogerse para medir la biomasa y la longitud de los brotes en el día 0.

44. Se introducen unos 3 cm de los brotes en el sedimento, que debe cubrir al menos dos nodos.

45. Las macetas se transfieren a continuación a los recipientes de ensayo en las mismas condiciones medioambientales que para la fase de exposición; se mantienen durante siete días en el medio de Smart y Barko con el fin de estimular el crecimiento de las raíces.

46. Después de este período, deben retirarse varias plantas de las macetas de reserva para inspeccionar el crecimiento de la raíz. Si no se aprecia ningún crecimiento (no hay visibles puntas de raíces), conviene prolongar la fase de implantación hasta que se aprecie el crecimiento de las raíces. Se recomienda llevar a cabo esta fase para garantizar que las plantas crecen activamente en el inicio del ensayo.

▼M7

**Selección de material vegetal homogéneo**

47. Para el diseño de ensayo A (un brote por maceta con tres macetas por recipiente), las macetas se seleccionan en función de su homogeneidad antes del inicio del ensayo. Para el diseño de ensayo B (tres brotes por maceta y una maceta por recipiente), las plantas sobrantes se retiran para dejar tres plantas de tamaño y aspecto uniformes.

**Exposición a través de la fase acuosa**

48. Las macetas, seleccionadas en función de su uniformidad, se colocan en los recipientes de ensayo según el diseño de ensayo elegido. A continuación, se añade el medio Smart y Barko a los recipientes de ensayo. Debe tenerse cuidado para evitar alterar el sedimento. Para ello, el medio puede añadirse con un embudo o se puede utilizar un plato de plástico para cubrir el sedimento mientras se vierte el medio en los recipientes de ensayo, siempre que el plato se quite inmediatamente después. También es posible colocar las macetas en los recipientes de ensayo después de haber añadido el medio. En ambos casos, al principio de la fase de exposición puede utilizarse medio recién preparado si resulta necesario para minimizar el posible desarrollo de algas y bacterias o preparar lotes únicos de solución de ensayo en las réplicas.

49. Hay que medir la longitud del brote por encima del sedimento, antes de añadir el medio o bien después.

50. Las cantidades apropiadas de producto problema pueden añadirse al medio de ensayo antes de verterlo en los recipientes de ensayo. El producto problema también se puede incorporar al medio después de haberlo añadido a los recipientes de ensayo. En este caso conviene asegurarse de que el producto problema se distribuye homogéneamente en el sistema de ensayo sin alterar el sedimento.

51. En cualquier caso, el aspecto (claro, turbio, etc.) del medio de ensayo se registrará al principio del ensayo.

**Exposición a través del sedimento**

52. Los sedimentos enriquecidos a la concentración elegida se preparan añadiendo una solución del producto problema directamente al sedimento recién preparado. Una solución madre del producto problema preparada con agua desionizada se mezcla con el sedimento artificial mediante molino de rodillos, mezcladora de piensos o a mano. Si el producto problema es poco soluble en agua, puede disolverse en el mínimo volumen posible de un disolvente orgánico apropiado (por ejemplo, hexano, acetona o cloroformo). Esta solución se mezcla a continuación con unos 10 g de arena de cuarzo fina para un solo recipiente de ensayo. Hay que dejar que el disolvente se evapore y, a continuación, la arena se mezcla con la cantidad adecuada de sedimento por vaso de ensayo. Para solubilizar, dispersar o emulsionar el producto problema solo pueden utilizarse agentes que se volatilicen rápidamente. El volumen/peso de la arena enriquecida con el producto problema tiene que tenerse en cuenta en la preparación final del sedimento (es decir, el sedimento debe prepararse entonces con menos arena). Debe velarse por que el producto problema añadido al sedimento se distribuya de forma total y homogénea por el sedimento.

53. Se pone en las macetas el sedimento enriquecido (como se ha descrito anteriormente). Las plantas que presenten un sistema radicular adecuado y sean homogéneas se retirarán de las macetas utilizadas durante la fase de implantación y se trasplantarán al sedimento enriquecido como se ha descrito anteriormente.

54. Las macetas se colocan en los recipientes de ensayo según el diseño de ensayo elegido. Se añade a continuación medio de Smart y Barko cuidadosamente (con un embudo), con el fin de evitar la alteración del sedimento. Hay que medir la longitud del brote por encima del sedimento, antes de añadir el medio o bien después.

▼M7

**Mantenimiento de los niveles de agua durante el período de ensayo**

55. Hay que registrar el volumen final del agua y el nivel del agua se marca en cada recipiente de ensayo. Si se evapora más de un 10 % del agua durante el ensayo, habrá que ajustar el nivel del agua con agua destilada. En caso necesario, los vasos deben cubrirse de forma no hermética con una tapa transparente de plástico para minimizar la evaporación y la contaminación con esporas de algas.

**Condiciones del ensayo**

56. Debe utilizarse una luz fluorescente blanca fría o cálida que dé una irradiancia de la luz de unos 140 (± 20) $\mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ cuando se mide como radiación activa para la fotosíntesis (400-700 nm) en la superficie del agua y usando un ciclo de luz-oscuridad de 16:8 horas. Las eventuales diferencias respecto a la irradiancia de la luz seleccionada no deben superar el ± 15 % en toda la superficie de ensayo.

57. La temperatura de los recipientes de ensayo debe ser de 20 ± 2 °C.

58. El pH del medio de testigo no debe subir más de 1,5 unidades durante el ensayo. Sin embargo, una desviación superior a 1,5 unidades no invalida el ensayo si puede demostrarse que se cumplen los criterios de validez especificados previamente.

**Duración del ensayo**

59. El período de exposición es de 14 días.

**Mediciones y determinaciones analíticas**

60. Tras la fase de implantación e inmediatamente antes de la exposición (es decir, el día 0), se recogen plantas de reserva de cinco macetas seleccionadas al azar en el diseño de tres plantas por maceta o de quince macetas en el diseño de una planta por maceta para evaluar la longitud de los brotes, así como el peso fresco y el peso seco como se describe a continuación.

61. Se realizan las evaluaciones siguientes, como se indica en el cuadro 1, en las plantas transferidas a la fase de exposición:

— las evaluaciones de la longitud de los brotes principales, el número y la longitud de los brotes laterales se registran como mínimo al final del período de exposición (por ejemplo, el día 14);

— las evaluaciones visuales de la salud de las plantas se registran al menos tres veces durante el período de exposición (por ejemplo, los días 0, 7 y 14).

— las evaluaciones del peso fresco y seco de los brotes se realizan al final del ensayo (es decir, el día 14).

62. La longitud de los brotes se mide con una regla. Si la planta presenta brotes laterales, habrá que contarlos y medir su longitud.

63. Las evaluaciones visuales de la salud de la planta se realizan registrando el aspecto de las plantas y el estado general del medio de ensayo. Algunas de las observaciones que deben tenerse en cuenta con las siguientes:

— necrosis, clorosis u otra decoloración, como enrojecimiento excesivo, con relación a las plantas de control;

— desarrollo de contaminación por algas o bacterias;

— anomalías de crecimiento, como retraso del crecimiento, alteración de la longitud internodal, malformaciones de los brotes o las hojas, proliferación de brotes laterales, pérdida de hojas, pérdida de turgencia y fragmentación del tallo;

▼M7

— evaluaciones visuales de la salud de las raíces, realizadas al final del ensayo, lavando con cuidado el sedimento de las raíces para poder observar el sistema radicular. A continuación, se muestra una escala propuesta para evaluar las plantas testigo:

(1) ausencia de raíces

(2) desarrollo radicular débil

(3) desarrollo radicular moderado

(4) muy buen desarrollo radicular, similar al de los testigos.

64. El peso fresco se determina al principio y al final del ensayo; para ello, se corta el tallo al nivel del sedimento y se seca con papael antes de pesarlo. Hay que asegurarse de retirar las partículas de sedimento que puedan adherirse a la base del brote. A continuación, los brotes se colocan en una estufa de secado a unos 60 °C y se secan hasta obtener un peso constante; luego, se pesan de nuevo y se registra el peso seco.

65. En el cuadro 1 se resumen las evaluaciones biológicas mínimas que deben efectuarse durante el ensayo.

*Cuadro 1*

**Programa de evaluación**

| Día después del tratamiento (DDAT) | *Myriophyllum spicatum* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Longitud del brote, número y longitud de brotes laterales | Evaluación visual de los brotes | Peso fresco y seco de los brotes Evaluación visual de las raíces | pH $O_2$ |
| 0 | A | A | A | A |
| 4 | — | — | — | — |
| 7 | — | A | — | A |
| 14 | A | A | A | A |

A: indica que hay que realizar las evaluaciones en ese día;
—: indica que las evaluaciones no son obligatorias.

*Frecuencia de las mediciones y determinaciones analíticas*

66. Debe registrarse, al menos una vez al día (o continuamente con un registrador de datos), la temperatura del medio en un recipiente adicional mantenido en las mismas condiciones en la cámara, incubadora o recinto de cultivo.

67. Hay que comprobar el pH y la concentración de oxígeno disuelto del medio de ensayo al principio del ensayo, al menos una vez durante el ensayo y al final del ensayo en todas las réplicas. Siempre habrá que tomar las mediciones a la misma hora del día. Si se usan disoluciones a granel para preparar todas las réplicas de cada concentración de ensayo, será posible realizar una única medición de cada disolución a granel en el día 0.

68. Debe medirse la irradiancia en la cámara, la incubadora o recinto de cultivo, en puntos equivalentes al nivel de la superficie del agua. Estas mediciones deben efectuarse al menos una vez al inicio del ensayo o durante el ensayo. El método de detección y medición de la luz, en particular el tipo de sensor, influye en el valor medido. La utilización de sensores esféricos (que responden a la luz desde todos los ángulos por encima y por debajo del plano de

▼M7

medición) y de sensores de «coseno» (que responden a la luz desde todos los ángulos por encima del plano de medición) es mejor que la de sensores unidireccionales, y proporciona lecturas más elevadas con una fuente luminosa multipuntual del tipo que se describe aquí.

*Mediciones analíticas del producto problema*

69. Hay que respaldar la correcta aplicación del producto problema con mediciones analíticas de las concentraciones del producto problema.

70. Deben recogerse muestras de agua para analizar el producto problema en todas las concentraciones de ensayo justo después de iniciar el ensayo (es decir, el día de la aplicación de los productos problema estables o una hora después de la aplicación de los productos que no son estables) y al final de ensayo.

71. Hay que establecer las concentraciones en el sedimento y en el agua intersticial del sedimento al principio y al final del ensayo, al menos en la concentración de ensayo mayor, salvo que se sepa que el producto problema es estable en el agua (> 80 % de la concentración nominal). Puede no ser necesario efectuar mediciones en el sedimento y en el agua intersticial si se ha determinado claramente el reparto del producto problema entre el agua y el sedimento en un estudio agua/sedimento en condiciones comparables (por ejemplo, proporción entre sedimento y agua, método de aplicación, tipo de aplicación).

72. Es posible que la toma de muestras de sedimento al principio del ensayo altere el sistema de ensayo. Por consiguiente, puede ser necesario tratar recipientes de ensayo adicionales para facilitar las determinaciones analíticas al principio y final de ensayo. Del mismo modo, cuando se considere necesario realizar evaluaciones intermedias (es decir, el día 7) y los análisis exijan grandes muestras de sedimento que no puedan tomarse fácilmente del sistema de ensayo, las determinaciones analíticas se realizarán utilizando recipientes de ensayo adicionales tratados de la misma manera que los usados para las evaluaciones biológicas.

73. Se recomienda aislar el agua intersticial mediante centrifugación a, por ejemplo, 10 000 g y 4 °C durante 30 minutos. Sin embargo, si se demuestra que el producto problema no se adsorbe a los filtros, también puede aceptarse la filtración. En algunos casos puede resultar imposible analizar las concentraciones en el agua intersticial si el tamaño de la muestra es demasiado pequeño.

74. Con ensayos semiestáticos (exposición a través de la fase acuosa) en los que no se prevea que la concentración de los productos problema relevantes permanezca en el intervalo del 20 % de la concentración nominal durante el período de ensayo sin renovación de las soluciones de ensayo, habrá que tomar muestras de soluciones de ensayo usadas y recién preparadas para analizar la concentración del producto problema en cada renovación.

75. En los casos en los que la concentración inicial medida del producto problema no esté dentro del intervalo del 20 % de la concentración nominal, pero en los que puedan aportarse pruebas suficientes de que las concentraciones iniciales son repetibles y estables (es decir, que están dentro del intervalo del 80-120 % de la concentración inicial), las determinaciones químicas podrían limitarse a las concentraciones de ensayo máxima y mínima.

76. En todos los casos, la determinación de las concentraciones del producto problema solo tendrá que efectuarse en uno de los recipientes replicados de cada concentración de ensayo. Otra opción consiste en efectuar dichos análisis reagrupando las soluciones de ensayo de todas las réplicas de cada concentración.

77. Si está demostrado que la concentración del producto problema se ha mantenido a lo largo de todo el ensayo dentro de un intervalo del 20 % de la concentración nominal o de la medida inicialmente, el análisis de los resultados y la posterior determinación de los parámetros puede basarse en los valores nominales o en los medidos inicialmente.

▼M7

78. En estos casos, las concentraciones de efecto deben basarse en las concentraciones de agua nominales o medidas al principio del ensayo.

79. Sin embargo, si hay indicios de que la concentración ha bajado (es decir, no se mantiene dentro del 20 % de la concentración nominal o de la medida inicialmente en el compartimento tratado) durante el ensayo, el análisis de los resultados deberá basarse en la media geométrica de la concentración durante la exposición o en modelos que describan el descenso de la concentración del producto problema en el compartimento tratado (11).

EVALUACIÓN DE LOS DATOS

80. Si es necesario utilizar un disolvente o dispersante, los datos de los testigos no tratados y los del disolvente pueden reagruparse para realizar los análisis estadísticos, siempre y cuando no haya diferencias estadísticas significativas entre las respuestas de los testigos no tratados y las de los testigos del disolvente.

**Variables de respuesta**

81. El objetivo del ensayo es determinar los efectos del producto problema sobre el crecimiento vegetativo de la especie sometida a ensayo, usando dos variables de respuesta (tasa media de crecimiento específico y rendimiento) de la siguiente manera:

*Tasa media de crecimiento específico*

82. Esta variable de respuesta se basa en los cambios de los logaritmos de la longitud total de los brotes, el peso fresco total de los brotes y el peso seco total de los brotes a lo largo del tiempo en los grupos testigo y de tratamiento. Esta variable se calcula para cada réplica de cada grupo testigo y de tratamiento. La longitud media y el peso medio de las tres plantas de un recipiente de ensayo (réplica) y, por consiguiente, la tasa de crecimiento de cada réplica, deben calcularse mediante la fórmula siguiente:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln (N_j) - \ln (N_i)}{t}$$

donde:

$\mu_{i-j}$ es la tasa media de crecimiento específico entre el tiempo i y el j;

$N_i$ es la variable de medición del recipiente de ensayo o testigo en el tiempo i;

$N_j$ es la variable de medición del recipiente de ensayo o testigo en el tiempo j;

t es el tiempo transcurrido entre i y j;

83. A partir de las respuestas de las réplicas ha de calcularse un valor medio de la tasa de crecimiento y una estimación de la varianza para cada grupo de tratamiento y testigo.

84. Debe calcularse la tasa media de crecimiento específico correspondiente a toda la duración del ensayo (el tiempo i en la fórmula anterior es el principio del ensayo y el tiempo j es el final del mismo). Respecto a cada concentración de ensayo testigo ha de calcularse un valor promedio de la tasa media de crecimiento específico con una estimación de la varianza.

▼M7

85. Después puede calcularse el porcentaje de inhibición de la tasa de crecimiento ($I_r$) correspondiente a cada concentración de ensayo (grupo de tratamiento) aplicando la fórmula siguiente:

$$\%I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

donde:

% $I_r$ es el porcentaje de inhibición de la tasa media de crecimiento específico;

$\mu_C$ es el valor medio de μ en el testigo;

$\mu_T$ es el valor medio de μ en el grupo de tratamiento.

*Rendimiento*

86. Esta variable de respuesta se basa en los cambios de la longitud total de los brotes, el peso fresco total de los brotes y el peso seco total de los brotes a lo largo del tiempo en los grupos testigo y de tratamiento. El porcentaje promedio de inhibición del rendimiento (% $I_y$) puede calcularse de la manera siguiente con cada grupo de tratamiento:

$$\%I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C}$$

donde:

% $I_y$ es el porcentaje de reducción del rendimiento;

$b_C$ es la biomasa final menos la biomasa inicial correspondiente al grupo testigo;

$b_T$ es la biomasa final menos la biomasa inicial correspondiente al grupo de tratamiento.

**Trazado de las curvas concentración-respuesta**

87. Se deben trazar las curvas concentración-respuesta que relacionan el porcentaje medio de inhibición de la variable de respuesta ($I_r$ o $I_y$), calculado como se indica anteriormente, y el logaritmo de la concentración del producto problema.

**Estimación de $EC_x$**

88. Las estimaciones de $EC_x$ (por ejemplo, $EC_{50}$) deben basarse tanto en la tasa media de crecimiento específico ($E_rC_x$) como en el rendimiento ($E_yC_x$), cada uno de los cuales debe basarse, a su vez, en el peso fresco total de los brotes, el peso seco total de los brotes y la longitud total de los brotes.

89. Ha de señalarse que los valores de $EC_x$ calculados a partir de estas dos variables de respuesta no son comparables y es necesario tener en cuenta esta diferencia cuando se utilicen los resultados del ensayo. Los valores de $EC_x$ basados en la tasa media de crecimiento específico ($E_rC_x$) son en la mayoría de los casos más elevados que los basados en el rendimiento ($E_yC_x$) si se respetan las condiciones del presente método de ensayo, debido al fundamento matemático de los planteamientos respectivos. Esta diferencia no debe interpretarse como una diferencia en la sensibilidad de las dos variables de respuesta, sino como una diferencia puramente matemática entre los valores.

**Procedimientos estadísticos**

90. El objetivo es obtener una relación concentración-respuesta cuantitativa mediante análisis de regresión. Es posible utilizar una regresión lineal ponderada después de haber efectuado una transformación linealizante de los datos de respuesta como, por ejemplo, en probit o logit o unidades Weibull (13), pero son preferibles los procedimientos de regresión no lineal porque con ellos se tratan mejor las inevitables irregularidades de los datos y las desviaciones respecto a distribuciones regulares. Si la inhibición está próxima al 0 o al 100 %, la transformación puede magnificar tales irregularidades, interfiriendo así con el análisis (13). Debe señalarse que los métodos normales

▼M7

de análisis que utilizan las transformaciones en probit, logit o de Weibull están previstos para aplicarse a datos cuantales (por ejemplo, mortalidad o supervivencia), y que es necesario modificarlos para aplicarlos a datos de tasas de crecimiento o rendimiento. En las referencias (14), (15), (16) y (17) pueden encontrarse métodos específicos de determinación de los valores de $EC_x$ a partir de datos continuos.

91. Respecto a cada variable de respuesta que haya de analizarse, se utilizará la relación concentración-respuesta para calcular estimaciones puntuales de los valores de $EC_x$. Hay que determinar los límites de confianza del 95 % para cada estimación y la bondad del ajuste de los datos de respuesta al modelo de regresión se evaluará de forma gráfica o estadística. El análisis de regresión se efectuará utilizando las respuestas de las distintas réplicas y no los promedios de los grupos de tratamiento.

92. Las estimaciones de la $EC_{50}$ y los límites de confianza pueden obtenerse también utilizando la interpolación lineal con *bootstrapping* (18) si los métodos o modelos de regresión disponibles no son adecuados para los datos.

93. Para la estimación de los valores de LOEC y, por tanto, de NOEC, es necesario comparar los promedios de tratamiento utilizando técnicas de análisis de la varianza (ANOVA). A continuación se compara la media obtenida para cada concentración con la del control aplicando un método de prueba adecuado (p. ej., prueba de Dunnett o Williams) (19) (20) (21) (22). Hay que comprobar si se sostiene la hipótesis del ANOVA de distribución normal (DN) y homogeneidad de la varianza (HV). Esta evaluación debe realizarse con la prueba de Shapiro-Wilks (DN) o de Levene (HV). El incumplimiento de la hipótesis de DN y homogeneidad de la varianza puede corregirse a veces mediante la transformación logarítmica de los datos. Si la heterogeneidad de la varianza o la desviación de la DN es extrema y no puede corregirse mediante transformación, ha de considerarse la posibilidad de efectuar un análisis por métodos como la prueba de t de Welch-Bonferroni, la prueba de tendencia de Jonkheere de ajuste secuencial de residuos o la prueba de medianas de Bonferroni. En (16) puede encontrarse más información sobre la determinación de la NOEC.

**PRESENTACIÓN DE INFORMES**

94. El informe del ensayo debe incluir la información siguiente:

*Producto problema*

Sustancia de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nomenclatura IUPAC o CAS, número CAS, notación SMILE o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica.

Sustancia de componentes múltiples, sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos (UVCB) o mezclas:

— deben caracterizarse en la medida de lo posible por la identidad química (véase el párrafo anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Especie de ensayo*

— nombre científico y procedencia.

*Condiciones del ensayo*

— duración y condiciones de la fase de implantación;

— procedimiento de ensayo aplicado (estático, semiestático o de dosis repetidas);

▼M7

— fecha de inicio y duración del ensayo;

— medio de ensayo, es decir, sedimento y medio nutritivo líquido;

— descripción del diseño experimental: cámara o recinto de cultivo o laboratorio, recipientes de ensayo y sus tapas, volúmenes de solución, longitud y peso de las plantas de ensayo por recipiente de ensayo al principio del ensayo, relación superficie de sedimento/superficie de agua, relación volumen de sedimento/volumen de agua;

— concentraciones de ensayo (nominales y medidas, según proceda) y número de réplicas por concentración;

— métodos de preparación de las soluciones madre y de ensayo, incluido el eventual uso de disolventes o dispersantes;

— temperatura durante el ensayo;

— fuente de luz, irradiancia ($\mu E \cdot m^{-2}\ s^{-1}$);

— valores de pH de los medios de ensayo y de control, así como aspecto del medio de ensayo al inicio y al final del ensayo;

— concentraciones de oxígeno;

— método de análisis con datos adecuados de evaluación de la calidad (estudios de validación, desviaciones típicas o límites de confianza de los análisis);

— métodos de determinación de las variables de medición, como longitud, peso seco o peso fresco;

— todas las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

*Resultados*

— datos en bruto: longitud de los brotes y peso de los brotes de las plantas/macetas y otras variables de medición en cada recipiente de ensayo y testigo en cada observación y momento de análisis, según el programa de evaluación indicado en el cuadro 1;

— medias y desviaciones típicas de cada variable de medición;

— curvas de crecimiento para cada concentración;

— tiempo de duplicación/tasa de crecimiento en el testigo según la longitud y el peso fresco de los brotes, incluido el coeficiente de variación del rendimiento según el peso fresco;

— variables de respuesta calculadas de cada réplica de tratamiento, con valores medios y coeficiente de variación de las réplicas;

— representación gráfica de la relación concentración-efecto;

— estimaciones de parámetros de la toxicidad correspondientes a variables de respuesta, por ejemplo, $EC_{50}$, e intervalos de confianza asociados. En caso de que se calculen la LOEC o la NOEC, se indicarán sus valores y los métodos estadísticos utilizados en su determinación;

— si se ha utilizado el ANOVA, el tamaño del efecto que puede observarse (por ejemplo, la diferencia significativa mínima);

— la eventual estimulación del crecimiento que se haya observado en cualquier recipiente de tratamiento;

▼M7

— los eventuales signos visuales de fitotoxicidad, así como observaciones de las soluciones de ensayo;

— discusión de los resultados, incluida la eventual influencia que tengan sobre ellos las desviaciones respecto al presente método de ensayo.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Capítulo C.26 del presente anexo*, Prueba de inhibición del crecimiento de Lemna sp.*

(2) Capítulo C.3 del presente anexo, *Prueba* de inhibición del crecimiento de algas y cianobacterias de agua dulce.

(3) Maltby, L. et al. (2010), Aquatic Macrophyte Risk Assessment for Pesticides, Guidance from the AMRAP Workshop in Wageningen (NL), 14-16 January 2008.

(4) Arts, G.H.P. et al. (2008), Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests, Environmental Pollution, Vol. 153, pp. 199-206.

(5) ISO 16191:2013 Water quality — Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of Myriophyllum aquaticum.

(6) Knauer, K. et al. (2006), Methods for assessing the toxicity of herbicides to submersed aquatic plants, Pest Management Science, Vol. 62/8, pp. 715-722.

(7) Capítulo C.50 del presente anexo, Ensayo de toxicidad sin sedimentos en *Myriophyllum spicatum*.

(8) Capítulo C.28 del presente anexo, Ensayo de toxicidad para quironómidos en sistemas sedimento-agua con agua enriquecida.

(9) Ratte, M., H. Ratte (2014), «Myriophyllum Toxicity Test: Result of a ring test using *M. aquaticum* and *M. spicatum* grown in a water-sediment system», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 206, OECD Publishing, Paris.

(10) Davies, J. et al. (2003), Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron — a case study, Pest Management Science, Vol. 59/2, pp. 231 — 237.

(11) OCDE (2000), «Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 23, OECD Publishing, Paris.

(12) Smart, R.M., J.W. Barko (1985), Laboratory culture of submersed freshwater macrophytes on natural sediments, Aquatic Botany, Vol. 21/3, pp. 251-263.

(13) Christensen, E.R., N. Nyholm (1984), Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves, Environmental Science Technology, Vol. 18/9, pp. 713-718.

(14) Nyholm, N. et al. (1992), Statistical treatment of data from microbial toxicity tests, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/2, pp. 157-167.

(15) Bruce, R.D., D.J. Versteeg (1992), A statistical procedure for modelling continuous toxicity data, Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 11/10, 1485-1494.

(16) OCDE (2006), «Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application», OECD Environment, Health and Safety Publications (EHS), Series on Testing and Assessment, No. 54, OECD Publishing, Paris.

(17) Brain, P., R. Cousens (1989), An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses, Weed Research, Vol. 29/2, pp/ 93-96.

▼**M7**

(18) Norberg-King, T.J. (1988), An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach, National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05-88. US EPA, Duluth, MN.

(19) Dunnett, C.W. (1955), A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control, Journal of the American Statistical Association, Vol. 50/272, pp. 1096-1121.

(20) Dunnett, C.W. (1964), New tables for multiple comparisons with a control, Biometrics, Vol. 20/3, pp. 482-491.

(21) Williams, D.A. (1971), A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control, Biometrics, Vol. 27/1, pp. 103-117.

(22) Williams, D.A. (1972), The comparison of several dose levels with a zero dose control, Biometrics, Vol. 28/2, pp. 519-531.

▼**M7**

*Apéndice 1*

**COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE SMART Y BARKO**

| Componente | Cantidad de reactivo añadido al agua (*) (mg/l) |
|---|---|
| $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$ | 91,7 |
| $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ | 69,0 |
| $NaHCO_3$ | 58,4 |
| $KHCO_3$ | 15,4 |
| pH (equilibrio con el aire) | 7,9 |

(*) Agua desmineralizada (es decir, destilada o desionizada)

▼M7

*Apéndice 2*

DEFINICIONES

**Biomasa**: peso fresco/seco de materia viva presente en una población. En este ensayo, la biomasa es la suma del brote principal, todas las ramas laterales y todas las raíces.

**Producto**: sustancia o mezcla.

**Clorosis**: cambio de color del verde al amarillento del organismo de ensayo, especialmente de los verticilos.

**ECx**: concentración del producto problema disuelta en el medio de ensayo que produce una reducción del x % (por ejemplo, del 50 %) en el crecimiento de *Myriophyllum spicatum* dentro de un plazo de exposición definido (que debe indicarse explícitamente si es distinto de la duración completa o normal del ensayo). Para expresar de forma inequívoca el valor de EC obtenido a partir de la tasa de crecimiento o del rendimiento, se usan respectivamente los símbolos «$E_rC$» y «$E_yC$», seguidos de la variable de medición que se ha utilizado, por ejemplo $E_rC$ (longitud del brote principal).

**Crecimiento**: aumento en la variable de medición, como la longitud del brote principal, longitud total de las ramas laterales, longitud total de los brotes, longitud total de las raíces, peso fresco, peso seco o número de verticilos durante el período de ensayo.

**Tasa de crecimiento** (tasa media de crecimiento específico): aumento logarítmico de la variable de medición durante el período de exposición. *Nota*: Las variables de respuesta relacionadas con la tasa de crecimiento son independientes de la duración del ensayo, siempre que el patrón de crecimiento de los organismos testigo no expuestos sea exponencial.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: concentración estudiada mínima a la que se observa que el producto ejerce un efecto estadísticamente significativo de reducción del crecimiento (con $p < 0,05$) cuando se compara con el testigo, dentro de un tiempo de exposición dado. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC).

**Variables de medición**: variables de cualquier tipo que se miden para expresar el parámetro del ensayo utilizando una o más variables de respuesta diferentes. En este método de ensayo son variables de medición la longitud del brote principal, la longitud total de las ramas laterales, la longitud total de los brotes, la longitud total de las raíces, el peso fresco, el peso seco y el número de verticilos.

**Monocultivo**: cultivo con una sola especie vegetal.

**Necrosis**: tejido muerto (es decir, blanco o marrón oscuro) del organismo de ensayo.

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: concentración estudiada que se encuentra inmediatamente por debajo de la LOEC.

**Variable de respuesta**: variable para la estimación de la toxicidad derivada de cualquier variable medida que describa la biomasa por distintos métodos de cálculo. A efectos del presente método de ensayo, la tasa de crecimiento y el rendimiento son variables de respuesta derivadas de variables de medición como la longitud del brote principal, la longitud total de los brotes, el peso fresco, el peso seco o el número de verticilos.

**Ensayo semiestático (de renovación)**: ensayo en que, a lo largo de su duración, la solución de ensayo se sustituye periódicamente, a intervalos específicos.

**Ensayo estático**: ensayo en que, a lo largo de su duración, no hay renovación de la solución de ensayo.

▼M7

**Producto problema**: sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**Parámetro del ensayo**: factor general que, como objetivo del ensayo, es modificado por el producto problema respecto al testigo. En este método, el parámetro del ensayo es la inhibición del crecimiento, que se puede expresar mediante diferentes variables de respuesta, basadas en una o más variables de medición.

**Medio de ensayo**: medio de cultivo sintético y completo en que crecen las plantas del ensayo cuando se exponen al producto problema. Este se disuelve en principio en el medio de ensayo.

**UVCB**: sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción y materiales biológicos.

**Rendimiento**: valor de una variable de medición para expresar la biomasa al final del período de exposición menos el valor de la variable de medición al inicio del período de exposición. Nota: Cuando el patrón de crecimiento de los organismos no expuestos sea exponencial, las variables de respuesta basadas en el rendimiento disminuirán con la duración del ensayo.

▼**M8**

## C.52. ENSAYO AMPLIADO DE REPRODUCCIÓN DE MEDAKA EN UNA GENERACIÓN (MEOGRT)

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método de ensayo es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 240 de la OCDE (2015). El ensayo ampliado de reproducción de medaka en una generación (MEOGRT, *Medaka Extended One Generation Test*) describe un método de ensayo completo con peces expuestos a lo largo de varias generaciones para ofrecer datos pertinentes sobre el peligro ecológico y la evaluación del riesgo de los productos, incluidos los alteradores endocrinos sospechosos. La exposición en el MEOGRT continúa hasta la eclosión (hasta dos semanas tras la fertilización, stf). Se necesitarían investigaciones adicionales para justificar la utilidad de ampliar la generación F2 más allá de la eclosión; por el momento no se dispone de información suficiente para establecer condiciones o criterios pertinentes que justifiquen la ampliación de la generación F2. No obstante, este método de ensayo puede actualizarse a medida que se vayan teniendo en cuenta nuevos datos e información. Por ejemplo, en determinadas circunstancias (como en caso de productos con alto potencial de bioconcentración o indicios de efectos transgeneracionales en otros taxones) puede ser útil disponer de orientaciones sobre la ampliación de la generación F2 a través de la reproducción. Este método de ensayo puede utilizarse para evaluar en los peces los posibles efectos crónicos de los productos, incluidos los posibles alteradores endocrinos. El método hace hincapié principalmente en los posibles efectos pertinentes de la población (en particular, los efectos adversos sobre la supervivencia, el desarrollo, el crecimiento y la reproducción) a efectos de cálculo de una concentración sin efecto observado (NOEC) o una concentración con efecto (CEx), aunque hay que señalar que los enfoques con CEx rara vez son adecuados para grandes estudios de este tipo, en los que el aumento del número de concentraciones de ensayo para permitir la determinación de la CEx deseada puede resultar poco práctico, y también puede causar problemas importantes en materia de bienestar de los animales debido al gran número de animales utilizados. En el caso de los productos que no requieren evaluación a lo largo de «varias generaciones» o en el de los productos que no son posibles alteradores endocrinos, pueden ser más adecuados otros métodos de ensayo (1). El medaka japonés es la especie adecuada para el presente método de ensayo, dado su breve ciclo de vida y la posibilidad de determinar su sexo genético (2), que se considera un componente fundamental de este método de ensayo. Los métodos específicos y los parámetros de observación detallados en este método son aplicables al medaka japonés únicamente. Es posible adaptar otras especies de peces pequeños (por ejemplo, el pez cebra) a un protocolo de ensayo similar.

2. Este método de ensayo mide varios parámetros biológicos. Se hace hincapié principalmente en los posibles efectos adversos sobre parámetros pertinentes para la población, como la supervivencia, el desarrollo macroscópico, el crecimiento y la reproducción. En segundo lugar, a fin de proporcionar información sobre el mecanismo y establecer un vínculo entre los resultados de otros tipos de estudios de campo y de laboratorio, cuando se dispone de pruebas *a posteriori* sobre un producto con posible actividad de alteración endocrina (por ejemplo, actividad androgénica o estrogénica en otras pruebas y ensayos), se obtiene otra información útil midiendo el ARNm de la vitelogenina (*vtg*) (o la proteína vitelogenina, VTG), los caracteres sexuales secundarios (CSS) fenotípicos en relación con el sexo genético, y evaluando el examen histopatológico. Cabe señalar que, si un producto problema o sus metabolitos no son sospechosos de ser alteradores endocrinos, puede que no sea necesario medir estos parámetros secundarios y entonces sería más adecuado recurrir a estudios con un uso menos intensivo de recursos y de animales (1). Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

▼**M8**

CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

3. Debido al número limitado de productos sometidos a ensayo y de laboratorios implicados en la validación de este ensayo, que es bastante complejo, se prevé que, cuando se disponga de un número suficiente de estudios para determinar el impacto de este nuevo diseño del estudio, se examinará el método de ensayo y, en caso necesario, se modificará a la luz de la experiencia adquirida. Los datos pueden utilizarse al nivel 5 del marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos (3). El método de ensayo comienza exponiendo el pez adulto (la generación F0) al producto problema durante la fase de reproducción. La exposición continúa a través del desarrollo y la reproducción de la generación F1 y la eclosión de la generación F2; por lo tanto, el ensayo permite la evaluación de las rutas endocrinas, tanto las estructurales como las que dependen de una activación. Al interpretar los parámetros relacionados con el sistema endocrino se podrá adoptar un enfoque de ponderación de las pruebas.

4. El ensayo debe incluir un número adecuado de individuos para garantizar la suficiente potencia a efectos de la evaluación de los parámetros pertinentes para la reproducción (véase el apéndice 3), al tiempo que se garantiza que el número de animales utilizados es el mínimo necesario por razones de bienestar de los animales. Teniendo en cuenta el gran número de animales de ensayo utilizados, es importante considerar cuidadosamente la necesidad de realizar el ensayo teniendo en cuenta los datos existentes, que ya pueden contener información pertinente sobre muchos de los parámetros del MEOGRT. Puede obtenerse ayuda a este respecto en el marco de ensayos de toxicidad con peces de la OCDE (1).

5. El método de ensayo se ha diseñado principalmente para distinguir los efectos de una sola sustancia. Sin embargo, si ha de realizarse el ensayo con una mezcla, hay que considerar entonces si va a proporcionar resultados adecuados para la finalidad normativa prevista.

6. Antes de iniciar el ensayo, es importante disponer de información sobre las propiedades fisicoquímicas del producto problema, en particular para permitir la obtención de soluciones estables del producto. También es necesario disponer de un método analítico suficientemente sensible para verificar las concentraciones del producto problema.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

7. Se inicia el ensayo exponiendo machos y hembras sexualmente maduros (de al menos 12 stf) que forman parejas de cría, a lo largo de 3 semanas, durante las cuales el producto problema se distribuye en el organismo de la generación parental (F0) según su comportamiento toxicocinético. Lo más cerca posible del primer día de la cuarta semana, se recogen los huevos para iniciar la generación F1. Durante la crianza de la generación F1 (un total de 15 semanas), se evalúan la capacidad de eclosión y la supervivencia. Además, se toman muestras de peces de 9-10 stf o para estudiar sus parámetros de desarrollo, y se evalúa el desove durante tres semanas, de la semana 12 a la 14 (stf). Se inicia una generación F2 después de la tercera semana de evaluación de la reproducción y se cría hasta la finalización de la eclosión.

CRITERIOS DE VALIDEZ DEL ENSAYO

8. Se aplicarán los siguientes criterios de validez del ensayo:

— La concentración de oxígeno disuelto ha de ser ≥ 60 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el ensayo;

— La temperatura media del agua a lo largo de toda la duración del estudio debe situarse entre 24 °C y 26 °C; las eventuales desviaciones de la media en los distintos acuarios no deben superar los 2 °C;

▼M8

— La fecundidad media de los testigos en cada una de las generaciones (F0 y F1) debe ser superior a 20 huevos por pareja y día. La fertilidad de todos los huevos producidos durante la evaluación debe ser superior al 80 %. Además, 16 de las 24 parejas de cría testigo recomendados (> 65 %) deben producir más de 20 huevos por pareja y por día;

— La capacidad de eclosión de los huevos debe ser ≥ 80 % (media) en los testigos (en cada generación F1 y F2);

— La supervivencia tras la eclosión hasta 3 stf y desde 3 stf hasta la finalización en el caso de la generación F1 (es decir, 15 stf) debe ser ≥ 80 % (media) y ≥ 90 % (media), respectivamente, en los testigos (F1);

— Debe disponerse de pruebas para demostrar que las concentraciones del producto problema en la solución se han mantenido satisfactoriamente dentro del intervalo de ± 20 % de la media de los valores medidos.

En cuanto a la temperatura del agua, aunque no es un criterio de validez, las réplicas de un tratamiento no deben ser estadísticamente diferentes entre sí, y los grupos de tratamiento dentro del ensayo no deben ser estadísticamente diferentes entre sí (sobre la base de las mediciones diarias de temperatura, y excluidas las eventuales desviaciones breves).

9. Aunque puede observarse una disminución de la reproducción en los grupos de exposición más elevada, la reproducción, al menos en el grupo de la tercera exposición más alta y en todos los grupos de exposición inferior de F0, debe ser suficiente para llenar las incubadoras de eclosión. Además, debe haber una adecuada supervivencia embrionaria en el grupo de la tercera exposición más alta y en los grupos de exposición inferior de F1 para permitir la evaluación de los parámetros en el muestreo de subadultos (véanse los puntos 36 y 38 y el apéndice 9). Además, debe haber al menos una supervivencia mínima tras la eclosión (~ 20 %) en el grupo de la segunda exposición más alta de F1. No se trata de criterios de validez en sí, sino de recomendaciones para permitir el cálculo de NOEC sólidas.

10. Si se observa una desviación de los criterios de validez del ensayo, se deben tener en cuenta las consecuencias en relación con la fiabilidad de los datos del ensayo y dichas desviaciones y consideraciones deben incluirse en el informe del ensayo.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

**Equipo**

11. Se emplea el equipo común de laboratorio y, en particular:

a) medidores de oxígeno y pH;

b) equipo para determinar la dureza y la alcalinidad del agua;

c) dispositivo adecuado de regulación de la temperatura, con supervisión preferiblemente continua;

d) recipientes de material químicamente inerte y con una capacidad adecuada a la carga y la densidad de población recomendadas (véase el apéndice 3);

e) una balanza suficientemente exacta (esto es, exactitud de ± 0,5 mg).

▼M8

**Agua**

12. Puede utilizarse para el ensayo toda agua en la que la especie de ensayo muestre unas tasas de crecimiento y supervivencia a largo plazo adecuadas. Su calidad ha de ser constante a lo largo de todo el ensayo. Deben tomarse muestras periódicamente para análisis con el fin de cerciorarse de que el agua de dilución no interfiere en los resultados del ensayo (por ejemplo, por complejación del producto problema) ni altera el comportamiento de los peces reproductores. Se debe proceder a la determinación de los metales pesados (p. ej., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de los aniones y cationes principales (p. ej., $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, $Cl^{-}$, $SO_4^{2-}$), plaguicidas, carbono orgánico total y sólidos en suspensión, por ejemplo cada seis meses cuando se sepa que el agua de dilución es de calidad relativamente constante. En el apéndice 2 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable. El pH del agua debe mantenerse entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de ± 0,5 unidades de pH.

**Sistema de exposición**

13. No se especifican el diseño ni los materiales utilizados para el sistema de exposición. Para la construcción del sistema de ensayo debe utilizarse vidrio, acero inoxidable u otro material químicamente inerte que no haya sido contaminado en ensayos previos. A los efectos del presente ensayo, un sistema de exposición adecuado puede consistir en un sistema de flujo continuo (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13).

**Soluciones de ensayo**

14. La solución madre del producto problema debe introducirse en el sistema de exposición mediante una bomba adecuada. El caudal de la solución madre debe calibrarse de acuerdo con la confirmación analítica de las soluciones de ensayo antes del inicio de la exposición, y comprobarse volumétricamente con regularidad durante el ensayo. La solución de ensayo en cada cámara se renueva adecuadamente (por ejemplo, un mínimo de 5 renovaciones y hasta 16 renovaciones de volumen al día o hasta 20 ml/min de flujo) en función de la estabilidad del producto problema y de la calidad del agua.

15. Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. La solución madre se prepara preferentemente por simple mezcla o agitación del producto problema en el agua de dilución por medios mecánicos (p. ej., mediante un agitador o ultrasonidos). Para lograr la concentración adecuada de la solución madre pueden emplearse columnas o sistemas de saturación o métodos de administración pasiva (14). Deben hacerse todos los esfuerzos posibles para evitar tener que recurrir a disolventes o vehículos por los siguientes motivos: 1) El uso de determinados disolventes puede desembocar en toxicidad o en respuestas indeseables o imprevistas; 2) la concentración de productos problema por encima de su hidrosolubilidad (como puede ocurrir con frecuencia si se utilizan disolventes) puede hacer que sean inexactas las determinaciones de las concentraciones efectivas; 3) el uso de disolventes en ensayos a largo plazo puede dar lugar a la formación de «biopelícula» en un grado significativo, asociada con una actividad microbiana que puede afectar a las condiciones medioambientales, así como a la capacidad de mantener las concentraciones de exposición, y 4) a falta de datos históricos que demuestren que el disolvente no influye en los resultados del estudio, el uso de disolventes impone la realización de un control del disolvente con implicaciones para el bienestar de los animales, ya que han de utilizarse más animales para llevar a cabo el ensayo. En caso de productos difíciles de ensayar, es posible utilizar un disolvente como último recurso, y debe consultarse el documento de orientación 23 de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas difíciles (*Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures*) (15). La elección del disolvente debe venir determinada por las propiedades químicas del producto problema y por la disponibilidad de datos históricos sobre el uso del disolvente. Si se utilizan vehículos disolventes, deben evaluarse controles adecuados del disolvente además de los testigos sin disolventes (negativos) (únicamente con el agua de dilución). En caso de que sea inevitable la utilización de un

▼M8

disolvente, y de que se encuentre actividad microbiana (biopelícula), se recomienda registrar/comunicar la formación de biopelícula por recipiente (al menos una vez por semana) a lo largo de todo el ensayo. Lo ideal es que la concentración de disolvente se mantenga constante en el control del disolvente y en todos los tratamientos de ensayo. Si la concentración del disolvente no se mantiene constante, en el control del disolvente debe utilizarse la mayor concentración de disolvente que se encuentre en el tratamiento de ensayo. En los casos en que se utilicen vehículos disolventes, las concentraciones máximas de disolvente no deben superar los 100 µl/l o 100 mg/l (15), y se recomienda mantener la concentración de disolvente lo más baja posible (p. ej., < 20 µl/l) para evitar cualquier posible efecto del disolvente sobre los parámetros medidos (16).

**Animales de experimentación**

*Selección y mantenimiento de los peces*

16. La especie estudiada es el medaka japonés (*Oryzias latipes*), debido a su breve ciclo de vida y a la posibilidad de determinar su sexo genético. Aunque otras especies de peces pequeños pueden adaptarse a un protocolo de ensayo similar, los métodos específicos y los parámetros de observación detallados en este método de ensayo son aplicables únicamente al medaka japonés (véase el punto 1). El medaka se induce fácilmente a criar en cautividad; existen métodos publicados para su cría (17) (18) (19), y se dispone de datos de ensayos sobre letalidad a corto plazo, de las primeras fases de la vida y de todo el ciclo de vida (5) (6) (8) (9) (20). Todos los peces se mantienen en un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Los peces se alimentan con nauplios vivos de artemia salina (*Artemia* spp.), que pueden complementarse en caso necesario con comida en copos disponible en el comercio. Debe analizarse periódicamente la presencia de contaminantes en la comida en copos disponible en el comercio.

17. En la medida en que se sigan las prácticas zootécnicas adecuadas, no será necesario un protocolo de cultivo específico. Por ejemplo, el medaka se puede criar en recipientes de 2 l con 240 larvas de peces por recipiente hasta 4 stf y luego pueden criarse en recipientes de 2 l con 10 peces por recipiente hasta 8 stf, en cuyo momento se pasa a parejas de cría en recipientes de 2 l.

*Aclimatación y selección de los peces*

18. Los peces de ensayo deben seleccionarse a partir de una única población de laboratorio que se haya aclimatado durante al menos dos semanas antes del ensayo en condiciones de calidad de agua e iluminación similares a las del ensayo (Nota: Este período de aclimatación no es un período de exposición previa *in situ*). Se recomienda que los peces de ensayo se obtengan de un cultivo interno, ya que el transporte de peces adultos es estresante y puede interferir con la fiabilidad del desove. Los peces deben ser alimentados con nauplios de artemia salina dos veces al día durante todo el período de mantenimiento y durante la fase de exposición, con el complemento, en caso necesario, de comida en copos disponible en el comercio. Para iniciar este ensayo se considera necesario un mínimo de 42 parejas de cría (54 parejas de cría si hace falta un control del disolvente debido, en parte, a la falta de datos históricos para apoyar el uso de solo el control sin disolvente) a fin de garantizar una replicación adecuada. Además, debe verificarse que cada pareja de cría de F0 sea XX-XY (es decir, el complemento normal de los cromosomas sexuales en cada sexo) a fin de evitar la posible inclusión de machos XX espontáneos (véase el punto 39).

▼**M8**

19. Durante la fase de aclimatación, se registrará la mortalidad entre los peces del cultivo y se aplicarán los siguientes criterios tras un período de adaptación de 48 horas:

— Si la mortalidad es superior al 10 % de la población del cultivo en los siete días anteriores a la transferencia al sistema de ensayo: se rechaza todo el lote;

— Si la mortalidad está entre el 5 % y el 10 % de la población en los siete días anteriores a la transferencia al sistema de ensayo: se prolonga la aclimatación durante siete días adicionales al período de aclimatación de 2 semanas; si durante este segundo período de siete días la mortalidad supera el 5 %, se rechaza todo el lote,

— Si la mortalidad es inferior al 5 % de la población en los siete días anteriores a la transferencia al sistema de ensayo: se acepta el lote.

20. Los peces no deben recibir tratamiento terapéutico alguno durante el período de aclimatación de dos semanas antes del ensayo ni durante el período de exposición, y los tratamientos terapéuticos deben evitarse completamente si es posible. No deben utilizarse en el estudio peces con signos clínicos de enfermedad. Debe mantenerse un registro de observaciones y de los eventuales tratamientos profilácticos y terapéuticos durante el período de cultivo anterior al ensayo.

21. La fase de exposición debe comenzar con peces adultos con sexo genéticamente asignado y sexualmente dimorfos, procedentes de un suministro de laboratorio de animales maduros para la reproducción, cultivados a 25 ± 2 °C. Los peces deben estar identificados como reproductores acreditados (es decir, que hayan producido crías viables) durante la semana anterior a la exposición. En todo el grupo de peces utilizados en el ensayo, los pesos individuales por sexo al inicio del ensayo deben mantenerse en el intervalo de ± 20 % de la media aritmética del peso del mismo sexo. Antes del ensayo debe pesarse una submuestra de peces para calcular el peso medio. Los peces seleccionados deben ser como mínimo de 12 stf, con un peso ≥ 300 mg en el caso de las hembras y ≥ 250 mg en el caso de los machos.

DISEÑO DEL ENSAYO

**Concentraciones de ensayo**

22. Se recomienda utilizar cinco concentraciones del producto más el testigo o testigos. Deben tenerse en cuenta todas las fuentes de información a la hora de seleccionar el intervalo de concentraciones de ensayo, incluidas las relaciones cuantitativas entre actividad y estructura (QSAR), la extrapolación a partir de análogos, los resultados de ensayos con peces, como los ensayos de toxicidad aguda (capítulo C.1 del presente anexo), el ensayo de reproducción de peces a corto plazo (capítulo C.48 del presente anexo) y otros métodos de ensayo como, por ejemplo, los capítulos C.15, C.37, C.41, C.47 o C.49 del presente anexo (21) (22) (23) (24) (25) si se dispone de ellos o, en caso necesario, de un ensayo de determinación del intervalo, con la posible inclusión de una fase de reproducción. Si es necesario, el ensayo de determinación del intervalo puede realizarse en condiciones (calidad del agua, sistema de ensayo, carga de animales) similares a las utilizadas para el ensayo definitivo. Si es necesario utilizar un disolvente y no se dispone de datos históricos, puede utilizarse el ensayo de determinación del intervalo para identificar la idoneidad del disolvente. La concentración de ensayo más elevada no debe superar la solubilidad en agua, 10 mg/l o 1/10 de la CL50 a las 96 h (27). La concentración más baja debe estar separada de la concentración más alta por un factor de entre 10 y 100 veces. El uso de

▼M8

cinco concentraciones en este ensayo permite no solo medir las relaciones dosis-respuesta, sino también la concentración mínima con efecto observado (LOEC) y la NOEC, que son necesarias para la evaluación del riesgo en algunos programas normativos o jurisdicciones. En general, el factor de separación entre concentraciones nominales del producto problema entre niveles de tratamiento adyacentes es ≤ 3,2.

**Réplicas dentro de los grupos de tratamiento y testigos**

23. Debe utilizarse un mínimo de seis cámaras de ensayo replicadas por concentración de ensayo (véase el apéndice 7). Durante la fase de reproducción (excepto la generación F0), la estructura de replicación se duplica para la evaluación de la fecundidad y cada réplica solo tiene una pareja de cría (véase el punto 42).

24. Además de las concentraciones de ensayo, deben someterse a ensayo un testigo del agua de dilución y, en caso necesario, un control del disolvente. Para garantizar una potencia estadística adecuada, debe utilizarse un número doble de cámaras replicadas de los testigos (es decir, deben utilizarse con los testigos al menos doce réplicas). Durante la fase de reproducción, se duplica el número de réplicas de los testigos (es decir, 24 réplicas como mínimo, y cada réplica solo tiene una pareja reproductora). Tras la reproducción, las réplicas de los testigos no deben contener más de 20 embriones (peces).

PROCEDIMIENTO

**Inicio del ensayo**

25. Los peces adultos activos en cuanto a la reproducción utilizados para iniciar la generación F0 del ensayo se seleccionan según dos criterios: edad (por lo general, más de 12 stf pero se recomienda no superar las 16 stf) y peso (debe ser ≥ 300 mg en las hembras y ≥ 250 mg en los machos).

26. Al inicio del ensayo se traslada una pareja macho-hembra que cumpla las especificaciones anteriores, como pareja aparte, a cada réplica de los recipientes, es decir, a doce réplicas de los testigos y seis réplicas de los tratamientos del producto. A estos recipientes se les asigna al azar un tratamiento (por ejemplo, T1-T5 y testigo) y una réplica (por ejemplo, A-L en los testigos y A-F en el tratamiento), y después se colocan en el sistema de exposición con el flujo adecuado a cada recipiente.

**Condiciones de exposición**

27. En el apéndice 3 figura un resumen completo de los parámetros y condiciones del ensayo. El cumplimiento de estas especificaciones debe hacer que los peces testigo den unos valores de los parámetros similares a los que figuran en el apéndice 4.

28. Durante el ensayo, debe medirse el oxígeno disuelto, el pH y la temperatura en al menos un recipiente de ensayo de cada grupo de tratamiento y el testigo. Como mínimo, estas mediciones, excepto las de la temperatura, deben efectuarse una vez por semana durante todo el tiempo de exposición. La temperatura media del agua durante toda la duración del estudio debe situarse entre 24 °C y 26 °C a lo largo de todo el ensayo. La temperatura debe medirse cada día durante todo el período de exposición. El pH del agua debe mantenerse entre 6,5 y 8,5, si bien a lo largo de un mismo ensayo debe permanecer en un intervalo de ± 0,5 unidades de pH. Las réplicas dentro de un tratamiento no deben ser estadísticamente diferentes entre sí, y los grupos de tratamiento dentro del ensayo no deben ser estadísticamente diferentes entre sí (sobre la base de las mediciones diarias de temperatura, y excluidas las eventuales desviaciones breves).

▼M8

**Duración de la exposición**

29. El ensayo expone a peces sexualmente reproductores de la F0 durante tres semanas. En la semana 4, aproximadamente el día 24 del ensayo, se establece la F1 y las parejas de cría de la F0 se sacrifican de forma compasiva y se registran el peso y la talla (véase el punto 34). A ello sigue la exposición de la generación F1 durante 14 semanas más (un total de 15 semanas para F1) y la de la generación F2 durante dos semanas hasta la eclosión. La duración total del ensayo es en principio de 19 semanas (es decir, hasta la eclosión de la F2). El calendario del ensayo se muestra en el cuadro 2 y se explica con más detalle en el apéndice 9.

**Régimen de alimentación**

30. Los peces pueden alimentarse con nauplios de 24 h de edad de artemia salina (*Artemia* spp.) *ad libitum*, complementados en caso necesario con comida en copos disponible en el comercio. Esta comida en copos disponible en el comercio debe analizarse periódicamente en cuanto a la presencia de contaminantes, tales como los plaguicidas organoclorados, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) o los policlorobifenilos (PCB). Debe evitarse la comida que tenga un nivel elevado de sustancias con actividad endocrina (es decir, fitoestrógenos) que puedan poner en peligro la respuesta del ensayo. La comida sobrante y la materia fecal deben retirarse de los recipientes de ensayo de la forma necesaria, por ejemplo limpiando bien el fondo de cada recipiente con un sifón. Los lados y el fondo de cada recipiente deben limpiarse también una o dos veces por semana (por ejemplo, raspando con una espátula). En el apéndice 5 figura un ejemplo de calendario de alimentación. La dosis alimentaria se basa en el número de peces por réplica. Por lo tanto, la dosis alimentaria se reduce si se produce mortalidad en una réplica.

**Determinación analítica y mediciones**

31. Antes de que comience el período de exposición, debe garantizarse el funcionamiento correcto del sistema de distribución del producto. Deben estar bien establecidos todos los métodos analíticos necesarios, incluidos los conocimientos suficientes sobre la estabilidad del producto en el sistema de ensayo. Durante el ensayo, las concentraciones del producto problema se determinan a intervalos apropiados, de preferencia al menos cada semana en una réplica de cada grupo de tratamiento, rotando cada semana entre las réplicas del mismo grupo de tratamiento.

32. Durante el ensayo, los caudales de diluyente y de solución madre deben comprobarse a intervalos adecuados (por ejemplo, un mínimo de tres veces por semana). Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. Sin embargo, si la concentración de producto problema en la solución se ha mantenido satisfactoriamente dentro del intervalo de ± 20 % de la media de los valores medidos durante todo el ensayo, los resultados pueden basarse entonces en los valores nominales o en los valores medidos. En caso de productos que se acumulan considerablemente en los peces, las concentraciones de ensayo pueden disminuir a medida que crecen los peces. En tales casos, se recomienda adaptar la tasa de renovación de la solución de ensayo en cada cámara para mantener la concentración de ensayo lo más constante posible.

***Observaciones y parámetros medidos***

33. Los parámetros medidos incluyen la fecundidad, la fertilidad, la eclosión, el crecimiento y la supervivencia para la evaluación de los posibles efectos a nivel de población. Los comportamientos también deben ser objeto de observaciones diarias, y debe registrarse todo comportamiento anómalo. Entre otros parámetros sobre el mecanismo se incluyen los niveles hepáticos de ARNm *vtg* o de la proteína VTG medidos con un inmunoanálisis (28), los marcadores fenotípicos sexuales tales como las características papilas de la aleta anal de los machos, la evaluación histológica del sexo gonadal y la evaluación histopatológica del riñón, hígado y gónadas (véase la lista de parámetros del cuadro 1). Todos estos parámetros específicos se evalúan en el contexto de la determinación del sexo genético del individuo, sobre la base de la presencia o ausencia del gen *dmy*, que determina el sexo

▼M8

masculino del medaka (véase el punto 41). Además, también se evalúa el tiempo hasta desovar. Por otra parte, pueden obtenerse las proporciones simples de sexos fenotípicos a partir de la información procedente de los recuentos de papilas de la aleta anal para definir cada espécimen de medaka como fenotípicamente macho o hembra. No se espera que este método de ensayo detecte desviaciones moderadas de la proporción prevista de sexos, ya que el número relativamente pequeño de peces por réplica no proporciona la suficiente potencia estadística. Asimismo, durante la evaluación histopatológica, se evalúa la gónada y se realizan análisis mucho más potentes para evaluar el fenotipo de las gónadas en el contexto del sexo genético.

34. El objetivo principal de este método de ensayo es evaluar los posibles efectos de un producto problema pertinentes para la población. Los parámetros sobre el mecanismo (VTG, CSS y determinados efectos histopatológicos en las gónadas) también pueden ayudar a determinar si algún efecto se ha mediado a través de la actividad endocrina. Sin embargo, estos parámetros sobre el mecanismo pueden verse influidos también por las toxicidades sistémicas y de otro tipo. Por lo tanto, también puede evaluarse detalladamente la histopatología hepática y renal para ayudar a comprender mejor las eventuales respuestas en los parámetros sobre el mecanismo. No obstante, si no se llevan a cabo estas evaluaciones detalladas, deben observarse y registrarse las anomalías macroscópicas observadas casualmente durante la evaluación histopatológica.

***Sacrificio compasivo de los peces***

35. A la terminación de la exposición de las generaciones F0 y F1, y cuando se submuestrean peces subadultos, los peces deben sacrificarse compasivamente con cantidades adecuadas de solución anestésica (por ejemplo, metanosulfonato de tricaína, MS-222, n.º CAS 886-86-2, 100-500 mg/l) amortiguada con solución de $NaHCO_3$ 300 mg/l (bicarbonato de sodio, n.º CAS 144-55-8) para reducir la irritación de las mucosas. Si los peces muestran signos de sufrimiento considerable (que sea muy intenso, y que pueda predecirse de manera fiable la muerte) y se consideran moribundos, los animales deben anestesiarse y sacrificarse de forma compasiva, y estos casos deben tratarse como mortalidad a efectos del análisis de los datos. Cuando se sacrifica un pez debido a la morbilidad, este extremo debe tenerse en cuenta y registrarse. En función del momento en que se sacrifique el pez durante el estudio, se puede conservar el pez para llevar a cabo un análisis histopatológico (fijando el pez con vistas al posible estudio de su histopatología).

***Manipulación de los huevos y larvas de los peces***

*Recogida de los huevos de las parejas de cría para propagar la siguiente generación*

36. La recogida de los huevos se realiza el primer día (o los primeros dos días, si es necesario) de la semana de ensayo 4 para pasar de F0 a F1, y de la semana de ensayo 18 para pasar de F1 a F2. La semana de ensayo 18 corresponde a peces adultos de la generación F1, de 15 stf (semanas tras la fertilización). Es importante retirar todos los huevos que haya en cada recipiente el día anterior a la fecha de recogida de los huevos, a fin de garantizar que todos los huevos recogidos de una pareja de cría proceden de un solo desove. Tras el desove, en ocasiones, el medaka hembra transporta sus huevos cerca de la cloaca hasta que puede depositarlos en la superficie de un sustrato. Si no hay ningún sustrato presente en el recipiente, los huevos pueden encontrarse sujetos a la hembra o al fondo del recipiente. En función de su ubicación, los huevos se retiran cuidadosamente de la hembra o se toman con sifón del fondo en la semana de ensayo 4 de F0 y en la semana de ensayo 18 de F1. Todos los huevos recogidos dentro de un tratamiento se ponen en común antes de su distribución en cámaras de incubación.

▼M8

37. Deben eliminarse los filamentos de huevos, que mantienen juntos los huevos desovados. Se recogen huevos fertilizados (hasta 20) de cada pareja de cría (1 pareja por réplica), se mezclan los de un mismo tratamiento y se distribuyen sistemáticamente en cámaras de incubación adecuadas (apéndices 6 y 7). Utilizando un microscopio de disección de buena calidad, se pueden ver signos distintivos de las primeras etapas de la fertilización/desarrollo, como la formación de la membrana de fertilización (corion), la división celular en curso o la formación de la blástula. Las cámaras de incubación podrán instalarse en «acuarios de incubación» separados para cada tratamiento (en cuyo caso deberán medirse en estos los parámetros de calidad del agua y las concentraciones del producto problema), o en el acuario paralelo en el que se incluirán las larvas que hayan eclosionado (por ejemplo, embriones libres). Si es necesario un segundo día de recogida (día de ensayo 23), todos los huevos de ambos días deberán mezclarse y redistribuirse sistemáticamente en cada una de las réplicas de tratamiento.

*Cría de los huevos hasta la eclosión*

38. Los huevos fertilizados se agitan continuamente, por ejemplo dentro de la incubadora de huevos mediante burbujeo de aire o balanceando verticalmente la incubadora de huevos. La mortalidad de los huevos fertilizados (embriones) se comprueba y registra diariamente. Los huevos muertos se retiran de las incubadoras (apéndice 9). En el 7.º día tras la fertilización (dtf), la agitación se detiene o se reduce, de modo que los huevos fertilizados se depositen en el fondo de la incubadora. Esto fomenta la eclosión, normalmente a lo largo de uno o dos días más. Respecto a cada tratamiento y cada testigo, se cuentan los animales eclosionados (larvas jóvenes, embriones libres) respecto a las réplicas mezcladas. Los huevos fertilizados que no hayan eclosionado en un período del doble del día mediano de eclosión del testigo (normalmente 16 o 18 dtf) se consideran inviables y se desechan.

39. Se transfieren doce animales eclosionados a cada recipiente replicado. Los animales que han eclosionado de las cámaras de incubación se mezclan y se distribuyen sistemáticamente entre los recipientes replicados (apéndice 7). Esto puede efectuarse seleccionando aleatoriamente un animal eclosionado de la mezcla de tratamiento para añadirlo de forma aleatoria a un acuario replicado. Cada uno de los recipientes debe contener un número igual (n = 12) de larvas eclosionadas (como máximo, 20 larvas cada uno). Si no hay suficientes animales eclosionados como para llenar todas las réplicas de tratamiento, se recomienda velar por que el mayor número posible de réplicas tenga 12 de estos animales. Los animales eclosionados pueden manipularse de manera segura con pipetas de vidrio de orificio grande. Los demás animales eclosionados se sacrifican de forma compasiva con anestesia. Durante las semanas previas a la configuración de las parejas de cría, debe registrarse el día en que se produzca el primer desove en cada réplica.

**Configuración de las parejas de cría**

*Recorte de las aletas y determinación del sexo genotípico*

40. Se determina el sexo genotípico recortando las aletas a las 9-10 stf (es decir, en la semana de ensayo 12-13 en el caso de la generación F1). Se anestesian todos los peces dentro de un recipiente (utilizando métodos aprobados, por ejemplo del IACUC) y se toma una pequeña muestra de tejido de la parte dorsal o ventral de la aleta caudal de cada pez para determinar el sexo genotípico del individuo (29). Los peces de una réplica pueden alojarse en jaulas pequeñas, si es posible uno por jaula, en el recipiente replicado. También es posible mantener dos peces en cada jaula siempre que se distingan uno del otro. Un método consiste en cortar de forma diferente la aleta caudal (por ejemplo, de uno se corta la punta ventral y del otro la dorsal) al tomar la muestra de tejido.

▼M8

41. El sexo genotípico del medaka se determina mediante la identificación y secuenciación de un gen (*dmy*) que se encuentra en el cromosoma Y. La presencia de *dmy* indica un individuo XY, sea cual sea el fenotipo, mientras que la ausencia de *dmy* indica un individuo XX, sea cual sea el fenotipo (30) (31). Se extrae ácido desoxirribonucleico (ADN) de cada recorte de aleta y la presencia o ausencia de *dmy* puede determinarse mediante métodos de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (véase el apéndice 9 del capítulo C.41 del presente anexo, o los apéndices 3 y 4 de la referencia 29).

*Establecimiento de las parejas de cría*

42. La información sobre el sexo genotípico se utiliza para establecer parejas de cría XX-XY con independencia del fenotipo externo, que puede estar alterado por la exposición a un producto problema. El día siguiente al de la determinación del sexo genotípico de cada pez, se seleccionan al azar dos peces XX y dos XY de cada réplica, y se establecen dos parejas de cría XX-XY. Si una réplica no tiene dos peces XX o dos peces XY, deben obtenerse los peces adecuados de otras réplicas dentro del tratamiento. La prioridad es tener el número recomendado de parejas de cría replicadas (12) en cada tratamiento y en los testigos (24). A la hora de establecer parejas de cría deben excluirse los peces con anormalidades evidentes (problemas de la vejiga natatoria, malformaciones vertebrales, variaciones extremas de tamaño, etc.). Durante la fase de reproducción de F1, cada recipiente en paralelo debe contener una sola pareja de cría.

**Muestreo de los subadultos y evaluación de los parámetros**

*Muestreo de los peces no incluidos en las parejas de cría*

43. Tras la configuración de las parejas de cría, los peces no seleccionados para la reproducción posterior se sacrifican de forma compasiva para la medición de los parámetros de los subadultos en la semana de ensayo 12-13 (F1). Es muy importante que los peces se manipulen de tal manera que pueda seguir asignándose a cada pez el sexo genotípico determinado para la selección de las parejas de cría. Todos los datos recogidos se analizan en el contexto del sexo genotípico del pez específico. Cada pez se utiliza para diversas mediciones de parámetros, entrelas que se incluyen las siguientes: determinación de las tasas de supervivencia de los peces juveniles/subadultos [semanas de ensayo 7-12/13 (F1)], crecimiento de la longitud [puede medirse la longitud estándar si se ha acortado la aleta caudal debido a un muestreo para el análisis del sexo genético; puede medirse la longitud total si solo se ha tomado una porción de la aleta caudal (dorsal o ventral) en el muestreo para detectar la presencia de *dmy*] y la masa corporal (es decir, peso húmedo, tras secar con material absorbente), ARNm de *vtg* (o VTG) y papilas de la aleta anal (véanse los cuadros 1 y 2). Obsérvese que también han de medirse los pesos y longitudes de las parejas de cría para calcular el crecimiento medio de un grupo de tratamiento.

*Muestreo de los tejidos y medición de la vitelogenina*

44. El hígado se diseca y se conserva a una temperatura ≤ -70 °C hasta que se realicen las mediciones del ARNm *vtg* (o de VTG). La cola de los peces, incluida la aleta anal, se conserva en un fijador adecuado (por ejemplo, el de Davidson) o se fotografía de manera que puedan contarse en una fecha posterior las papilas de la aleta anal. Si se desea, en ese momento pueden muestrearse y conservarse otros tejidos (es decir, las gónadas). Debe cuantificarse la concentración de VTG en el hígado con una técnica ELISA homóloga (véanse los procedimientos recomendados para el medaka en el apéndice 6 del capítulo C.48 del presente anexo). Como alternativa, la EPA de EE. UU. ha establecido los métodos para la cuantificación del ARNm *vtg*, es decir, la extracción del ARNm del gen *vtg I* de una muestra de hígado y la cuantificación del número de copias del gen *vtg I* (por ng de ARNm total) mediante RCP cuantitativa (29). En lugar de determinar el número de copias

▼M8

del gen *vtg* en los grupos testigo y de tratamiento, un método que consume menos recursos y es menos difícil técnicamente es el de determinar el cambio relativo (número de veces) de la expresión de *vtg I* de los grupos testigo y de tratamiento.

*Características sexuales secundarias*

45. En circunstancias normales, solo el medaka macho sexualmente maduro tiene papilas, que se desarrollan en los segmentos de determinados radios de la aleta anal como una característica sexual secundaria, proporcionando un biomarcador potencial de los efectos de alteración endocrina. En el apéndice 8 figura el método de recuento de las papilas de la aleta anal (el número de segmentos con papilas). También se utiliza el número de papilas de la aleta anal por individuo para clasificar al individuo como macho o hembra fenotípico externamente a fin de calcular una proporción simple de sexos por réplica. Se definen como machos los medakas con cualquier número de papilas superior a 0; se definen como hembras los medakas con 0 papilas de la aleta anal.

**Evaluación de la fecundidad y de la fertilidad**

46. La fecundidad y la fertilidad se evalúan en las semanas de ensayo 1 a 3 en la generación F0 y en las semanas de ensayo 15 a 17 en la generación F1. Se recogen diariamente los huevos de cada pareja de cría durante 21 días consecutivos. Cada mañana, los huevos se retiran suavemente de las hembras retenidas en una red y/o se toman con sifón del fondo del acuario. Se registran diariamente tanto la fecundidad como la fertilidad de cada pareja de cría en paralelo. La fecundidad se define como el número de huevos desovados y la fertilidad se define funcionalmente como el número de huevos fertilizados y viables en el momento del recuento. El recuento debe hacerse lo antes posible tras la recogida de los huevos.

47. La fecundidad de las réplicas se registra diariamente como el número de huevos por pareja de cría que se analiza mediante los procedimientos estadísticos recomendados utilizando las medias de las réplicas. La fertilidad de las réplicas es la suma del número de huevos fértiles producidos por una pareja de cría dividido por la suma del número de huevos producidos por esa pareja. La fertilidad se analiza estadísticamente como una proporción por réplica. La capacidad de eclosión de las réplicas es el número de animales eclosionados dividido por el número de embriones cargados (normalmente 20). La capacidad de eclosión se analiza estadísticamente como una proporción por réplica.

**Muestreo de los adultos y evaluación de los parámetros**

*Muestreo de los peces incluidos en las parejas de cría*

48. Tras la semana de ensayo 17 (es decir, después de que se haya iniciado con éxito la generación F2), los adultos F1 se sacrifican de forma compasiva y se evalúan diversos parámetros (véanse los cuadros 1 y 2). Se forman imágenes de la aleta anal para evaluar las papilas de esta (véase el apéndice 8), y/o se retira la cola, inmediatamente por detrás de la cloaca, y se fija para efectuar más tarde el recuento de las papilas. Puede tomarse una muestra de una porción de la aleta caudal y guardarse por el momento para la verificación del sexo genético (*dmy*), si se desea. En caso necesario, puede tomarse una muestra de tejido para repetir el análisis de *dmy* a fin de verificar el sexo genético de los distintos peces. Se abre la cavidad corporal para permitir la perfusión con fijadores adecuados (por ejemplo, el de Davidson) antes de sumergir todo el cuerpo en el fijador. No obstante, si se realiza una fase de permeabilización adecuada antes de la fijación, no es necesario abrir la cavidad corporal.

▼**M8**

*Histopatología*

49. Cada pez se evalúa en cuanto a la histopatología de las gónadas (30) (29). Como se indica en el punto 33, otros parámetros sobre el mecanismo evaluados en este ensayo (es decir, VTG, CSS y determinados efectos histopatológicos en las gónadas) pueden estar influidos por la toxicidad sistémica o de otro tipo. Por lo tanto, la histopatología hepática y renal también puede evaluarse detalladamente para ayudar a comprender mejor las eventuales respuestas en los parámetros sobre el mecanismo. No obstante, si no se llevan a cabo estas evaluaciones detalladas, deben observarse y registrarse las anomalías macroscópicas observadas casualmente durante la evaluación histopatológica. Puede considerarse la «lectura descendiente» desde el grupo de tratamiento más alto (respecto al testigo) hasta un tratamiento sin efecto; sin embargo, se recomienda consultar las orientaciones sobre histopatología (29). Por lo general, todas las muestras se tratan o se seccionan, tras lo cual las estudia el histopatólogo. Si se utiliza un enfoque de «lectura descendiente», se señala que la modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage por cortes (RSCABS) se basa en la expectativa de que, a medida que aumenten los niveles de dosis, también aumentará el impacto biológico (la patología). Por lo tanto, se perderá potencia si únicamente se considera una sola dosis alta sin ninguna dosis intermedia. Si no es necesario el análisis estadístico para determinar que la dosis alta no tiene ningún efecto, entonces puede aceptarse este enfoque. El fenotipo de las gónadas se deriva también de esta evaluación.

*Otras observaciones*

50. El MEOGRT proporciona datos que pueden utilizarse (por ejemplo, con un enfoque de ponderación de las pruebas) para evaluar simultáneamente al menos dos tipos generales de rutas de resultados adversos (AOP) que desembocan en el deterioro de la función reproductora: a) rutas con intervención endocrina que implican la alteración del eje endocrino hipotálamo-hipófisis-gónadas (eje HPG), y b) rutas que provocan la reducción de la supervivencia, el crecimiento (longitud y peso) y la reproducción debido a toxicidad sin intervención endocrina. En este ensayo también se incluyen parámetros que se suelen medir en ensayos de toxicidad crónica, tales como el ensayo de todo el ciclo de vida y el ensayo de las primeras fases de la vida, y que pueden utilizarse para evaluar los peligros que plantean los modos tóxicos de acción sin intervención endocrina y las rutas de toxicidad con intervención endocrina. Durante el ensayo, el comportamiento debe ser objeto de observaciones diarias, y debe registrarse todo comportamiento anómalo. Además, debe registrarse la eventual mortalidad y debe calcularse la supervivencia hasta el sacrificio parcial de los peces (semana de ensayo 6/7), la supervivencia tras el sacrificio parcial hasta el muestreo de subadultos (9-10 stf) y la supervivencia desde el emparejamiento hasta el muestreo de peces adultos.

*Cuadro 1*

**Resumen de los parámetros del MEOGRT** (*)

| Fase de la vida | Parámetro | Generación |
|---|---|---|
| Embriones (2 stf) | Eclosión (% y tiempo hasta la eclosión) | F1, F2 |
| Juveniles (4 stf) | Supervivencia | F1 |
| Subadultos (9 o 10 stf) | Supervivencia | F1 |
| | Crecimiento (longitud y peso) | |

▼M8

| Fase de la vida | Parámetro | Generación |
|---|---|---|
| | Vitelogenina (ARNm o proteína) | |
| | Características sexuales secundarias (papilas de la aleta anal) | |
| | Proporción externa de sexos | |
| | Tiempo hasta el primer desove | |
| Adultos (12-14 stf) | Reproducción (fecundidad y fertilidad) | F0, F1 |
| Adultos (15 stf) | Supervivencia | F1 |
| | Crecimiento (longitud y peso) | |
| | Características sexuales secundarias (papilas de la aleta anal) | |
| | Histopatología (gónadas, hígado, riñones) | |

(*) Estos parámetros deben analizarse estadísticamente.

CALENDARIO

51. En el cuadro 2 se muestra un calendario del MEOGRT. Este incluye 4 semanas de exposición para los adultos de la generación F0 y 15 semanas de exposición para la generación F1, y el período de exposición para la segunda generación (F2), hasta la eclosión (2 stf). En el apéndice 9 figura un resumen de la actividad a lo largo del MEOGRT.

*Cuadro 2*

**Calendario de exposición y de medición de parámetros del MEOGRT**

**Calendario de exposición y parámetros del MEOGRT**

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F0 | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | | | | | | | | | | | | |
| F1 | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| F2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | 1 | 2 |
| Semana de ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
| **Clave de la etapa de la vida** | | | | | **Embriones** | | | | | **Larvas** | | | | | **Juveniles** | | | **Subadultos** | **Adultos** |
| Parámetros | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Fecundidad | $F_0$ | | | | | | | | | | | | | | $F_1$ | | | | |
| Fertilidad | $F_0$ | | | | | | | | | | | | | | $F_1$ | | | | |
| Eclosión | | | | | $F_1$ | | | | | | | | | | | | | | $F_2$ |
| Supervivencia | | | | | | $F_1$ | | | | | | $F_1$ | | | | | | $F_1$ | |
| Crecimiento | | | | $F_0$ | | | | | | | | $F_1$ | | | | | | $F_1$ | |
| Vitelogenina | | | | | | | | | | | | $F_1$ | | | | | | | |
| Características sexuales secundarias | | | | | | | | | | | | $F_1$ | | | | | | $F_1$ | |
| Histopatología | | | | | | | | | | | | | | | | | | $F_1$ | |
| Semana de ensayo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |

- El diseño experimental tiene 7 grupos de réplicas:
  - 5 para los tratamientos con el producto problema
  - 2 para los tratamientos testigo (4 si se utiliza disolvente)
- Diseño dentro del grupo
  - 12 réplicas para la reproducción, patología de adultos y CSS (sem. 10 a 18)
  - 6 réplicas para la eclosión, la supervivencia, la Vtg; y CSS y crecimiento de subadultos (sem. 1 a 9)

CSS: características sexuales secundarias;
Sem.: semanas;
Vtg: vitelogenina

▼M8

DATOS E INFORME

**Análisis estadístico**

52. Dado que se determina el sexo genotípico de todos los peces del ensayo, los datos deben analizarse aparte por cada sexo genotípico (es decir, machos XY y hembras XX). En caso contrario, se reducirá considerablemente la potencia estadística de cualquier análisis. Es preferible que los análisis estadísticos de los datos sigan los procedimientos descritos en el Documento de la OCDE sobre enfoques actuales del análisis de datos de ecotoxicidad, orientaciones sobre la aplicación (32). El apéndice 10 proporciona más orientaciones para el análisis estadístico.

53. El diseño del ensayo y la selección de las pruebas estadísticas deben aportar una potencia adecuada para detectar los cambios de importancia biológica en los parámetros respecto a los que debe comunicarse una NOEC (32). La comunicación de las concentraciones y parámetros con efectos pertinentes puede depender del marco normativo. Debe identificarse el cambio porcentual en cada uno de los parámetros que sea importante detectar o estimar. El diseño experimental debe ajustarse para que esto sea posible. No es probable que se aplique la misma variación porcentual a todos los parámetros, y tampoco lo es que se pueda diseñar un experimento factible que cumpla dichas condiciones para todos los parámetros. Por ello es importante centrarse en los parámetros relevantes para el experimento en cuestión a la hora de diseñarlo adecuadamente. En el apéndice 10 se ofrece un diagrama de flujo estadístico y orientaciones para ayudar al tratamiento de los datos y a la elección del ensayo o modelo estadístico más adecuado para su utilización. Se podrán usar otros enfoques estadísticos, siempre que estén científicamente justificados.

54. Será preciso analizar las variaciones dentro de cada serie de réplicas en paralelo mediante procedimientos de análisis de la varianza o tablas de contingencia y se usarán suficientes métodos de análisis estadísticos adecuados en función de los resultados obtenidos. Para realizar una comparación múltiple entre los resultados a cada concentración y los de los testigos, se recomienda seguir el procedimiento de ajuste secuencial (por ejemplo, la prueba de Jonckheere-Terpstra) en caso de respuestas continuas. Si los datos no son coherentes con una relación concentración-respuesta monótona, deben utilizarse las pruebas de Dunnett o de Dunn (tras una transformación adecuada de los datos, si es necesario).

55. En cuanto a la fecundidad, se efectúan diariamente recuentos de los huevos, pero pueden analizarse como recuento de los huevos totales o como medición repetida. En el apéndice 10 se presentan los detalles de cómo se analiza este parámetro. Con respecto a los datos de histopatología en forma de puntuaciones de intensidad, se ha desarrollado una nueva prueba estadística, la modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage por cortes (RSCABS) (33).

56. Deberán indicarse todos los parámetros observados en los tratamientos con el producto que sean significativamente diferentes de los de los testigos adecuados.

**Consideraciones relativas al análisis de los datos**

*Uso de niveles de tratamiento alterados*

57. Hay varios factores que se tienen en cuenta a la hora de determinar si una réplica o un tratamiento entero muestran toxicidad manifiesta y deben eliminarse del análisis. La toxicidad manifiesta se define como una mortalidad > 4 muertes en cualquier réplica entre 3 stf y 9 stf que no se puedan explicar por un error técnico. Entre otros signos de toxicidad manifiesta se incluyen hemorragia, comportamientos anómalos, forma anómala de nadar, anorexia y

▼M8

cualquier otro signo clínico de enfermedad. En lo que respecta a los signos de toxicidad subletales, es posible que sea necesario realizar evaluaciones cualitativas, que siempre deben hacerse en relación con el grupo testigo del agua de dilución (solo agua limpia). Si es evidente que hay toxicidad manifiesta en el tratamiento o tratamientos más altos, se recomienda proceder a la censura estadística de dichos tratamientos en el análisis.

*Controles del disolvente*

58. El uso de un disolvente solo debe plantearse como último recurso, una vez consideradas todas las demás opciones de distribución del producto. Si se utiliza un disolvente, debe haber conjuntamente un testigo del agua de dilución. Al finalizar el ensayo, debe efectuarse una evaluación de los efectos potenciales del disolvente. Esto se realiza mediante una comparación estadística del grupo control del disolvente y del grupo testigo del agua de dilución. Los parámetros más pertinentes que deben tenerse en cuenta en este análisis son los factores determinantes del crecimiento (peso), ya que pueden verse afectados por una toxicidad generalizada. Si se detectan diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros entre el grupo testigo del agua de dilución y el grupo control del disolvente, debe aplicarse el mejor juicio profesional para determinar si está afectada la validez del ensayo. Si los dos grupos difieren, deben compararse con el control del disolvente los tratamientos expuestos al producto, a menos que se sepa que es preferible la comparación con el testigo del agua de dilución. Si no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, se recomienda comparar los tratamientos expuestos al producto problema con los grupos reunidos (grupo control del disolvente y grupo testigo del agua de dilución), a menos que se sepa que es preferible la comparación solo con el grupo testigo del agua de dilución o con el grupo control del disolvente.

**Informe del ensayo**

59. El informe del ensayo debe incluir lo siguiente:

*Producto problema: naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas;*

— Datos de identificación química.

Sustancias de un solo componente:

— aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

— identificación química, como nombres IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica (incluido el contenido de carbono orgánico, si procede).

Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

— caracterizadas en la medida de lo posible por la identidad química (véase el párrafo anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Especie de ensayo:*

— Nombre científico, cepa si se conoce, fuente y método de recogida de los huevos fertilizados y manipulaciones posteriores.

*Condiciones del ensayo:*

— Fotoperíodo o fotoperíodos;

— Diseño del ensayo (por ejemplo, tamaño, material y volumen de agua de la cámara, número de cámaras de ensayo y de réplicas, número de animales eclosionados por réplica);

▼**M8**

— Método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificará el agente solubilizante empleado y su concentración);

— Método de administración del producto problema (p. ej., bombas, sistemas de dilución);

— Eficiencia de recuperación del método y concentraciones nominales de ensayo, límite de detección, medias de los valores medidos en los recipientes de ensayo y sus desviaciones típicas, método de obtención y datos que muestren que las mediciones se refieren a las concentraciones del producto problema en disolución verdadera;

— Características del agua de dilución: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), carbono orgánico total, sólidos en suspensión (si se ha medido), salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada;

— Concentraciones nominales de ensayo, medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas;

— Calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, temperatura (diaria) y concentración de oxígeno disuelto;

— Información detallada de la alimentación (por ejemplo, tipo de alimentos, procedencia, cantidad proporcionada y frecuencia).

*Resultados:*

— Prueba de que los testigos cumplen los criterios generales de validación;

— Datos de los grupos testigo (más control del disolvente cuando se utilice) y de tratamiento como se indica a continuación, eclosión (capacidad de eclosión y tiempo hasta esta) de F1 y F2, supervivencia tras la eclosión de F1, crecimiento (longitud y peso corporal) de F1, sexo genotípico y diferenciación sexual (por ejemplo, caracteres sexuales secundarios sobre la base de las papilas de la aleta anal y de la histología de las gónadas) de F1, sexo fenotípico de F1, caracteres sexuales secundarios (papilas de la aleta anal) de F1, ARNm *vtg* (o proteína VTG) de F1, evaluación histopatológica (gónadas, hígado y riñones) de F1 y reproducción (fecundidad y fertilidad) de F0 y F1 (véanse los cuadros 1 y 2);

— Enfoque del análisis (análisis de regresión o análisis de la varianza) y tratamiento estadístico de los datos (pruebas y modelos estadísticos utilizados);

— Concentración sin efecto observado (NOEC) para cada respuesta evaluada;

— Concentración mínima con efecto observado (LOEC) para cada respuesta evaluada (con $p = 0,05$); $CE_x$ para cada respuesta evaluada, si procede, e intervalos de confianza (p. ej., del 90 % o del 95 %), así como una representación gráfica del modelo ajustado usado para su cálculo, la pendiente de la curva de concentración-respuesta, la fórmula del modelo de regresión, los parámetros estimados del modelo y sus errores típicos;

— Eventuales desviaciones de este método de ensayo y de los criterios de aceptación, así como consideración de sus posibles consecuencias sobre el resultado del ensayo.

▼M8

60. En cuanto a los resultados de las mediciones de los parámetros, deben presentarse los valores medios y sus desviaciones típicas (tanto en relación con las réplicas como en relación con las concentraciones, si es posible).

**BIBLIOGRAFÍA**


(1) OCDE (2012 a). Fish Toxicity Testing Framework, Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 171), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(2) Padilla S, Cowden J, Hinton DE, Yuen B, Law S, Kullman SW, Johnson R, Hardman RC, Flynn K and Au DWT. (2009). Use of Medaka in Toxicity Testing. Current Protocols in Toxicology 39: 1-36.

(3) OCDE (2012b). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(4) Benoit DA, Mattson VR, Olson DL. (1982). A Continuous-Flow Mini-Diluter System for Toxicity Testing. Water Research 16: 457-464.

(5) Yokota H, Tsuruda Y, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Nakazono A, Honjo T and Kobayashi K. (2000). Effect of Bisphenol A on the Early Life Stage in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 19: 1925-1930.

(6) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T and Kobayashi K. (2001). Life-Cycle Toxicity of 4-Nonylphenol to Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 20: 2552-2560.

(7) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Yamaguchi T, Maeda M, Imada N, Tadokoro H and Honjo T. (2002). Effects of 17β-Estradiol on the Reproduction of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*). Chemosphere 47: 71-80.

(8) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Tsuruda Y, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2002). Effect of Ethinylestradiol on the Reproduction and Induction of Vitellogenin and Testis-Ova in Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 21: 1692-1698.

(9) Seki M, Yokota H, Matsubara H, Maeda M, Tadokoro H and Kobayashi K. (2003). Fish Full Life-Cycle Testing for the Weak Estrogen 4-T*ert*-Pentylphenol on Medaka (*Oryzias Latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry 22: 1487-1496.

(10) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006a). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Effect of Exposure Period on Spawning Performance in Sex-Transformed Females. Aquatic Toxicology 79: 288-295.

(11) Hirai N, Nanba A, Koshio M, Kondo T, Morita M and Tatarazako N. (2006b). Feminization of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 17β-Estradiol: Formation of Testis-Ova and Sex-Transformation During Early-Ontogeny. Aquatic Toxicology 77: 78-86.

(12) Nakamaura A, Tamura I, Takanobu H, Yamamuro M, Iguchi T and Tatarazako N. (2015). Fish Multigeneration Test with Preliminary Short-Term Reproduction Assay for Estrone Using Japanese Medaka (*Oryzias Latipes)*. Journal of Applied Toxicology 35:11-23.

(13) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report. Disponible en: http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2013/062513meeting.html.

(14) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P and McLachlan M. (2012). A Flow-Through Passive Dosing System for Continuously Supplying Aqueous Solutions of Hydrophobic Chemicals to Bioconcentration and Aquatic Toxicity Tests. Chemosphere 86: 593-599.

▼**M8**

(15) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 23), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(16) Hutchinson TH., Shillabeer N., Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(17) Denny JS, Spehar RL, Mead KE and Yousuff SC. (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. US EPA/600/3-91/064.

(18) Koger CS, Teh SJ and Hinton DE. (1999). Variations of Light and Temperature Regimes and Resulting Effects on Reproductive Parameters in Medaka (*Oryzias Latipes*). Biology of Reproduction 61: 1287-1293.

(19) Kinoshita M, Murata K, Naruse K and Tanaka M. (2009). Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, Wiley- Blackwell.

(20) Gormley K and Teather K. (2003). Developmental, Behavioral, and Reproductive Effects Experienced by Japanese Medaka in Response to Short-Term Exposure to Endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54: 330-338.

(21) Capítulo C.15 del presente anexo, Ensayo de toxicidad a corto plazo en embriones de pez y alevines.

(22) Capítulo C.37 del presente anexo, Ensayo de veintiún días en peces: cribado a corto plazo de la actividad estrogénica y androgénica y de la inhibición de la aromatasa.

(23) Capítulo C.41 del presente anexo, Ensayo de desarrollo sexual en peces.

(24) Capítulo C.48 del presente anexo, Ensayo de reproducción de peces a corto plazo.

(25) Capítulo C.47 del presente anexo, Ensayo de toxicidad en las primeras fases de vida de los peces.

(26) Capítulo C.49 del presente anexo, Ensayo de toxicidad aguda en embriones de pez (FET).

(27) Wheeler JR, Panter GH, Weltje L and Thorpe KL. (2013). Test Concentration Setting for Fish *In Viv*o Endocrine Screening Assays. Chemosphere 92: 1067-1076.

(28) Tatarazako N, Koshio M, Hori H, Morita M and Iguchi T. (2004). Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Vitellogenin in the Medaka. Journal of Health Science 50: 301-308.

(29) OCDE (2015). Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment (No. 227). Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(30) Nanda I, Hornung U, Kondo M, Schmid M and Schartl M. (2003). Common Spontaneous Sex-Reversed XX Males of the Medaka *Oryzias Latipes*. Genetics 163: 245-251.

(31) Shinomiya, A, Otake H. Togashi K. Hamaguchi S and Sakaizumi M. (2004). Field Survey of Sex-Reversals in the Medaka, *Oryzias Latipes*: Genotypic Sexing of Wild Populations, Zoological Science 21: 613-619.

(32) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), Publicaciones de la OCDE, París.

(33) Green JW, Springer TA, Saulnier AN and Swintek J. (2014). Statistical Analysis of Histopathology Endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33: 1108-1116.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**ELISA**: Enzimoinmunoanálisis de adsorción.

**Fecundidad**: Número de huevos.

**Fertilidad**: Número de huevos viables / fecundidad.

**Longitud furcal (FL, *fork length*)**: Longitud desde la punta del hocico hasta la escotadura de la aleta caudal. Se utiliza en peces en los que es difícil apreciar dónde termina la columna vertebral (www.fishbase.org).

**Capacidad de eclosión**: Número de animales eclosionados / número de embriones cargados en una incubadora.

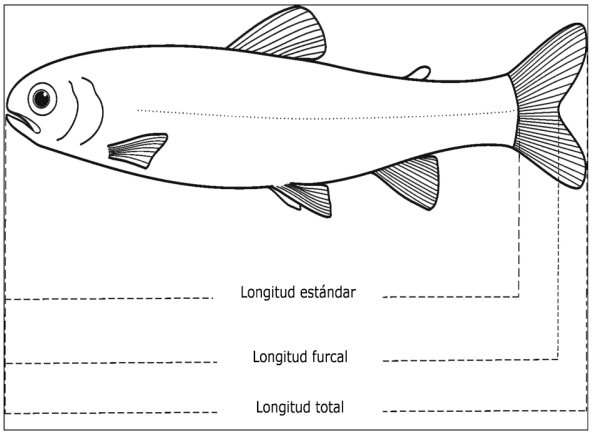
**IACUC**: Comité de Utilización y Cuidado de Animales en Instituciones (Institutional Animal Care and Use Committee).

**Longitud estándar (SL, *standard length*)**: Longitud de un pez medida desde la punta del hocico hasta el extremo posterior de la última vértebra o hasta el extremo posterior de la parte mediolateral de la placa hipural. Básicamente, en esta medida se excluye la aleta caudal (www.fishbase.org).

**Longitud total (TL, *total length*)**: Longitud desde la punta del hocico hasta la punta del lóbulo más largo de la aleta caudal, normalmente medida con los lóbulos comprimidos a lo largo de la línea media. Se mide en línea recta, y no siguiendo la curvatura del cuerpo (www.fishbase.org).

*Figura 1*

**Descripción de las diferentes longitudes utilizadas.**




**CEx:** Concentración con efecto del x %; es la concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado período de exposición cuando se compara con un testigo. Por ejemplo, una CE50 es una concentración de la que se estima que causa un efecto sobre un parámetro de ensayo en el 50 % de una población expuesta a lo largo de un determinado período de exposición.

**Ensayo dinámico**: Ensayo con un flujo continuo de soluciones de ensayo por el sistema de ensayo durante la duración de la exposición.

**Eje HPG**: Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (*hypothalamic-pituitary-gonadal*).

▼**M8**

**IUPAC**: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

**Tasa de carga**: Peso húmedo de peces por unidad de volumen de agua.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: Concentración más baja de producto problema con la que se observa un efecto estadístico significativo (con $p < 0,05$) en comparación con el testigo. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC). En los apéndices 5 y 6 se recogen las orientaciones pertinentes.

**Concentración letal mediana (CL50)**: Concentración de un producto problema de la que se estima que mata al 50 % de los organismos de ensayo durante la duración del ensayo.

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: Concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el testigo, no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro del período de exposición establecido.

**SMILES**: Sistema Simplificado de Registro de Líneas Moleculares (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

**Densidad de población**: Número de peces por unidad de volumen de agua.

**Producto problema**: Sustancia o mezcla estudiada con este método de ensayo.

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos.

**VTG**: La vitelogenina es una fosfolipoglucoproteína precursora de la proteína de la yema de huevo que normalmente se produce en las hembras sexualmente activas de todas las especies ovíparas.

**STF**: Semanas tras la fertilización.

▼**M8**

*Apéndice 2*

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL AGUA DE DILUCIÓN ADECUADA

| Sustancia | Límite de concentración |
|---|---|
| Partículas | 5 mg/l |
| Carbono orgánico total | 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | 1 µg/l |
| Cloro residual | 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | 25 ng/l |
| Aluminio | 1 µg/l |
| Arsénico | 1 µg/l |
| Cromo | 1 µg/l |
| Cobalto | 1 µg/l |
| Cobre | 1 µg/l |
| Hierro | 1 µg/l |
| Plomo | 1 µg/l |
| Níquel | 1 µg/l |
| Cinc | 1 µg/l |
| Cadmio | 100 ng/l |
| Mercurio | 100 ng/l |
| Plata | 100 ng/l |

▼**M8**

*Apéndice 3*

CONDICIONES DE ENSAYO DEL MEOGRT

| | | |
|---|---|---|
| 1. | Especie recomendada | Medaka japonés (*Oryzias latipes*) |
| 2. | Tipo de ensayo | Dinámico continuo |
| 3. | Temperatura del agua | La temperatura nominal de ensayo es de 25ºC. La temperatura media a lo largo del ensayo en cada recipiente es de 24-26ºC. |
| 4. | Calidad de la iluminación | Bombillas fluorescentes (amplio espectro y ~ 150 lúmenes/$m^2$) (~ 150 lux). |
| 5. | Fotoperíodo | 16 h de luz, 8 h de oscuridad |
| 6. | Tasa de carga | F0: 2 adultos/réplica; F1: se inicia con un máximo de 20 huevos (embriones)/réplica, se reduce a 12 embriones/réplica en la eclosión, después a 2 adultos (pareja de cría XX-XY) a las 9-10 stf para la fase de reproducción |
| 7. | Volumen mínimo utilizable de la cámara de ensayo | 1,8 l (por ejemplo, tamaño de la cámara de ensayo: 18 x 9 x 15 cm) |
| 8. | Intercambios de volumen de las soluciones de ensayo | Desde un mínimo de 5 renovaciones de volumen / día hasta 16 renovaciones de volumen / día de volumen (o flujo de 20 ml/minuto) |
| 9. | Edad de los organismos de ensayo en el momento del inicio | F0: > 12 stf pero se recomienda no superar 16 stf |
| 10. | Número de organismos por réplica | F0: 2 peces (pareja de macho y hembra); F1: Máximo 20 peces (huevos) / réplica (producidos a partir de parejas de cría F0 y F1). |
| 11. | Número de tratamientos | 5 tratamientos con el producto problema más el testigo o testigos adecuados |
| 12. | Número de réplicas por tratamiento | Mínimo de 6 réplicas por tratamiento con producto problema y mínimo de 12 réplicas del testigo, y del control del disolvente, si se utiliza (el número de réplicas se duplica dentro de la fase de reproducción en F1). |
| 13. | Número de organismos por ensayo | Mínimo de 84 peces en F0 y 504 en F1. (Si se utiliza el control del disolvente, entonces 108 peces en F0 y 648 peces en F1). La unidad contabilizada es el animal que ha pasado la fase de embrión libre. |
| 14. | Régimen de alimentación | Los peces se alimentan con nauplios de 24 h de edad de artemia salina (*Artemia* spp.) *ad libitum*, complementados en caso necesario con comida en copos disponible en el comercio (véase en el apéndice 5 un ejemplo de programa de alimentación para garantizar un crecimiento y desarrollo adecuados que permitan una sólida reproducción). |

▼**M8**

| | |
|---|---|
| 15. Aireación | Ninguna, a menos que la proporción de oxígeno disuelto se acerque a valores < 60 % del valor de saturación del aire |
| 16. Agua de dilución | Agua limpia superficial, de pozo o reconstituida, o agua corriente desclorada |
| 17. Período de exposición | En principio 19 semanas (de F0 a la eclosión de F2) |
| 18. Parámetros biológicos (primarios) | Capacidad de eclosión (F1 y F2); supervivencia [F1, desde la eclosión hasta 4 stf (final de la fase de larva / comienzo de la fase de juvenil), de 4 a 9 (o 10) stf (del comienzo de la fase de juvenil a la de subadulto) y de 9 a 15 stf (de subadulto a la finalización como adulto)]; crecimiento (F1, longitud y peso a 9 y 15 stf); características sexuales secundarias (F1, papilas de la aleta anal a 9 y 15 stf); vitelogenina (F1, ARNm *vtg* o proteína VTG a 15 stf); sexo fenotípico (F1, por medio de la histología de las gónadas a 15 stf); reproducción (F0 y F1, fecundidad y fertilidad durante 21 días); tiempo hasta desovar (F1); e histopatología (F1, gónadas, hígado y riñón a 15 stf) |
| 19. Criterios de validez del ensayo | Oxígeno disuelto ≥ 60 % del valor de saturación del aire; temperatura media del agua de 24-26$^{o}$C durante todo el ensayo; reproducción con éxito de > 65 % de las hembras del testigo o testigos; fecundidad media diaria de > 20 huevos en el testigo o testigos; capacidad de eclosión ≥ 80 % (media) en los testigos (en cada generación F1 y F2); supervivencia después de la eclosión hasta las 3 stf de ≥ 80 % (media) y desde las 3 stf hasta la terminación en cuanto a la generación ≥ 90 % (media) en los testigos (F1), las concentraciones del producto problema en la solución deben mantenerse de forma satisfactoria dentro del intervalo de ± 20 % de la media de los valores medidos. |

▼**M8**

*Apéndice 4*

ORIENTACIONES SOBRE LOS VALORES TÍPICOS DE LOS TESTIGOS

Cabe señalar que estos valores de los testigos se basan en un número limitado de estudios de validación y pueden ser objeto de modificaciones a la luz de la experiencia que se vaya adquiriendo.

*Crecimiento*

Se miden el peso y la longitud de todos los peces muestreados a las 9 (o 10) y 15 semanas tras la fertilización (stf). Si se sigue este protocolo, se espera obtener a las 9 stf un peso húmedo de 85-145 mg en el caso de los machos y de 95-150 mg en el de las hembras. Los pesos previstos a las 15 stf son de 250-330 mg en el caso de los machos y de 280-350 mg en el de las hembras. Si bien pueden producirse desviaciones importantes de estos intervalos en los distintos peces, unos pesos medios de los testigos fuera de estos intervalos, especialmente por debajo, sugerirían problemas relacionados con la alimentación, el control de la temperatura, la calidad del agua, las enfermedades o cualquier combinación de estos factores.

*Eclosión*

En general, el éxito de la eclosión en los testigos se sitúa en torno al 90 %; sin embargo, no es infrecuente encontrar valores tan bajos como el 80 %. Un éxito de la eclosión inferior al 75 % puede indicar una agitación insuficiente de los huevos en desarrollo o una atención insuficiente a la hora de manipular los huevos, como por ejemplo cuando no se retiran a tiempo los huevos muertos, lo que provoca una infestación fúngica.

*Supervivencia*

Las tasas de supervivencia hasta las 3 stf desde la eclosión y después de las 3 stf suelen ser del 90 % o más en los testigos, pero no son alarmantes unas tasas de supervivencia en las fases iniciales de la vida tan bajas como el 80 % en los testigos. El encontrar en los testigos unas tasas de supervivencia inferiores al 80 % sería motivo de preocupación y podría indicar una limpieza insuficiente de los acuarios, pérdida de larvas de peces por enfermedad o por asfixia debida a los bajos niveles de oxígeno disuelto. La mortalidad también puede producirse como resultado de lesiones producidas durante la limpieza del recipiente y por la pérdida de larvas de peces por el desagüe del recipiente.

*Gen de la vitelogenina*

Si bien los niveles absolutos del gen de la *vitelogenina* (*vtg*), expresados como número de copias/ng de ARNm total, pueden variar considerablemente entre los laboratorios debido a los procedimientos o al instrumental utilizados, la proporción de *vtg* de las hembras testigo debe ser aproximadamente 200 veces superior a la de los machos testigo. No es infrecuente que esta proporción llegue a estar entre 1 000 y 2 000 veces; sin embargo, las proporciones de menos de 200 veces son sospechosas y pueden indicar problemas con la contaminación de la muestra o problemas con el procedimiento o los reactivos utilizados.

*Características sexuales secundarias*

En el caso de los machos, el intervalo normal de los caracteres sexuales secundarios, definidos como el número total de segmentos de los radios de la aleta anal que tienen papilas, es de 40-80 segmentos a las 9-10 stf. Para las15 stf, el intervalo de los machos testigo debe ser de aproximadamente 80-120, y de 0 en el caso de las hembras testigo. Por razones desconocidas, en raras ocasiones algunos machos no tienen papilas presentes a las 9 stf pero, dado que todos los machos testigo tienen papilas a las 15 stf, lo más probable es que esto se deba a un retraso en el desarrollo. La presencia de papilas en las hembras testigo indica la presencia de machos XX en la población.

▼**M8**

*Machos XX*

La incidencia de fondo normal de machos XX en el cultivo resulta ser de aproximadamente un 4 % o menos a 25°C, con una incidencia que aumenta al aumentar la temperatura. Deben tomarse medidas para reducir al mínimo la proporción de machos XX en la población. Puesto que resulta que la incidencia de machos XX tiene un componente genético y, por tanto, es hereditaria, vigilar la población del cultivo y velar por que no se utilicen machos XX para propagar dicha población es un medio eficaz para reducir la incidencia de machos XX en la población.

*Actividad de desove*

La actividad de desove en las réplicas testigo debe ser objeto de seguimiento diario antes de realizar la evaluación de la fecundidad. Las parejas testigo pueden evaluarse visualmente de forma cualitativa para comprobar la existencia de la actividad de desove. Para las 12-14 stf, la mayoría de las parejas testigo deben estar desovando. Un bajo número de parejas desovando en este momento indicaría posibles problemas relacionados con la salud, la madurez o el bienestar de los peces.

*Fecundidad*

Los medakas con buena salud y buena alimentación suelen desovar diariamente a las 12-14 stf, poniendo entre 15 y 50 huevos al día. La producción de huevos de 16 de las 24 parejas de cría testigo recomendadas (> 65 %) debe ser de más de 20 huevos por pareja y día, y puede llegar a unos 40 huevos al día. Si la producción es inferior a esta cantidad, puede ser un signo de que las parejas de desove son inmaduras, están desnutridas o no tienen buena salud.

*Fertilidad*

La proporción de huevos fértiles de las parejas de desove testigo se encuentra normalmente en la zona del 90 %, no siendo raro encontrar valores en la parte media y superior de la banda del 90-100 %. Las tasas de fertilidad inferiores al 80 % de los huevos testigo son sospechosas y pueden indicar que se trata de individuos poco sanos o que las condiciones de cultivo no son ideales.

▼**M8**

*Apéndice 5*

EJEMPLO DE PROGRAMA DE ALIMENTACIÓN

En el cuadro 1 se muestra un ejemplo de programa de alimentación para garantizar un crecimiento y desarrollo adecuados que permitan una sólida reproducción. Puede aceptarse que haya desviaciones de este programa de alimentación, pero en tales casos se recomienda comprobar que se han observado un crecimiento y una reproducción aceptables. Con el fin de seguir el programa de alimentación propuesto, antes de comenzar el ensayo debe determinarse el peso seco de artemia salina por volumen de suspensión de artemia salina. Para ello, se puede pesar un volumen definido de suspensión de artemia salina que se haya secado durante 24 horas a 60 °C en recipientes previamente pesados. Para tener en cuenta el peso de las sales en la suspensión, un mismo volumen de la solución salina utilizada en la suspensión debe también secarse, pesarse y restarse del peso de la suspensión de artemia salina secada. Como alternativa, la artemia salina puede filtrarse y enjuagarse con agua destilada antes de secarse, eliminando así la necesidad de medir el peso de un «blanco de sal». Esta información se utiliza para poder pasar la información contenida en el cuadro de peso seco de artemia salina a volumen de suspensión de artemia salina que debe darse como alimento por pez. Además, se recomienda pesar semanalmente partes alícuotas de la suspensión de artemia salina para comprobar que es correcto el peso seco de artemia salina que se da como alimento.

*Cuadro 1*

**Ejemplo de programa de alimentación**

| Tiempo (tras la eclosión) | Artemia salina (mg de peso seco / pez / día) |
|---|---|
| Día 1 | 0,5 |
| Día 2 | 0,5 |
| Día 3 | 0,6 |
| Día 4 | 0,7 |
| Día 5 | 0,8 |
| Día 6 | 1,0 |
| Día 7 | 1,3 |
| Día 8 | 1,7 |
| Día 9 | 2,2 |
| Día 10 | 2,8 |
| Día 11 | 3,5 |
| Día 12 | 4,2 |
| Día 13 | 4,5 |
| Día 14 | 4,8 |
| Día 15 | 5,2 |
| Días 16-21 | 5,6 |

▼**M8**

| Tiempo (tras la eclosión) | Artemia salina (mg de peso seco / pez / día) |
|---|---|
| Semana 4 | 7,7 |
| Semana 5 | 9,0 |
| Semana 6 | 11,0 |
| Semana 7 | 13,5 |
| Semana 8 - sacrificio | 22,5 |

▼**M8**

*Apéndice 6*

EJEMPLOS DE CÁMARAS DE INCUBACIÓN DE HUEVOS

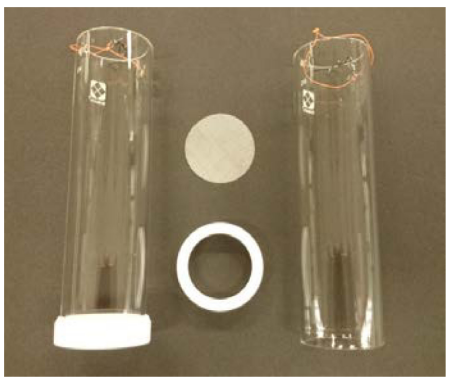
*Ejemplo A*





Esta incubadora consiste en un tubo de centrífuga de cristal cortado transversalmente, conectado mediante un manguito de acero inoxidable y mantenido en su sitio por el tapón superior de rosca de la centrífuga. Un pequeño tubo de vidrio o acero inoxidable pasa a través del tapón y se coloca cerca del fondo redondeado, burbujeando aire suavemente para suspender los huevos y reducir la transmisión entre huevos de infecciones por hongos saprófitos, así como facilitar el intercambio químico entre la incubadora y el recipiente de mantenimiento.

*Ejemplo B*



▼**M8**



Esta incubadora consta de un cuerpo cilíndrico de vidrio (de 5 cm de diámetro y 10 cm de altura) y de malla de alambre inoxidable (0,25 φ y 32 mallas) que está fijada a la parte inferior del cuerpo con un anillo de PTFE. Se suspenden las incubadoras de la barra de elevación en los recipientes y se agitan verticalmente (aproximadamente 5 cm de amplitud) en un ciclo adecuado (aproximadamente una vez cada 4 segundos) en el caso de los huevos de medaka.

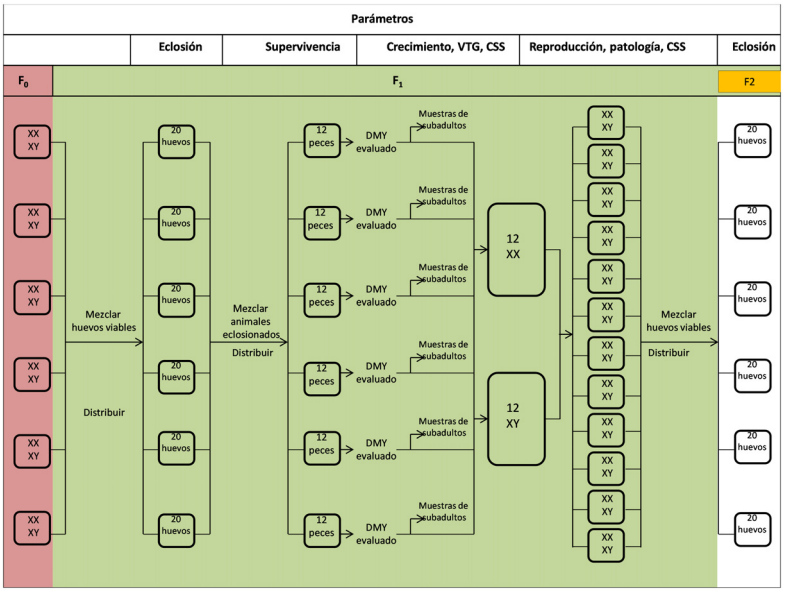
▼M8

*Apéndice 7*

DIAGRAMA ESQUEMÁTICO PARA MEZCLAR Y POBLAR LAS RÉPLICAS EN EL MÉTODO DE ENSAYO MEOGRT

*Figura 1*

**Mezcla y repoblación de las réplicas en el MEOGRT. La figura representa un tratamiento o la mitad de un testigo. Debido a la mezcla, la identidad de las réplicas no se mantiene continuamente durante todo el ensayo. Téngase en cuenta que el término «huevos» se refiere a huevos fertilizados viables (equivalentes a embriones).**




**Tratamientos y replicación**

El método de ensayo recomienda cinco tratamientos con producto problema de calidad técnica y un testigo negativo. El número de réplicas por tratamiento no permanece constante en todo el MEOGRT, y el número de réplicas en el testigo es el doble del de cualquier tratamiento con producto problema. En F0, cada tratamiento con producto problema tiene seis réplicas, mientras que el testigo negativo tiene doce réplicas. Los disolventes son muy desaconsejables y, si se utilizan, debe incluirse en el informe del MEOGRT una justificación tanto de la utilización de un disolvente como de la elección del disolvente concreto. Asimismo, si se utiliza un disolvente, son necesarios dos tipos de testigos: a) un control del disolvente, y b) un testigo negativo. Estos dos grupos testigo deben consistir cada uno en un conjunto completo de réplicas en todos los puntos del calendario del MEOGRT. Durante el desarrollo del organismo de ensayo en la generación F1 (y en la F2, hasta la eclosión), esta estructura de las réplicas sigue siendo la misma. Sin embargo, en la fase adulta, cuando se configuran las parejas de cría F1, lo mejor es duplicar el número de réplicas de parejas de cría por tratamiento; por lo tanto, hay hasta doce parejas replicadas en cada tratamiento con producto problema y veinticuatro parejas replicadas en el grupo testigo (y otras veinticuatro parejas replicadas en el control del disolvente, en caso necesario). La determinación de la eclosión de los embriones puestos por las parejas F1 se hace con la misma estructura de réplicas que con los embriones puestos por las parejas F0, lo que significa inicialmente seis réplicas por tratamiento con producto problema y doce réplicas en el grupo o grupos testigo.

▼**M8**

*Apéndice 8*

RECUENTO DE LAS PAPILAS DE LA ALETA ANAL

***Materiales y reactivos principales***

— Microscopía de disección (con cámara opcional adjunta)

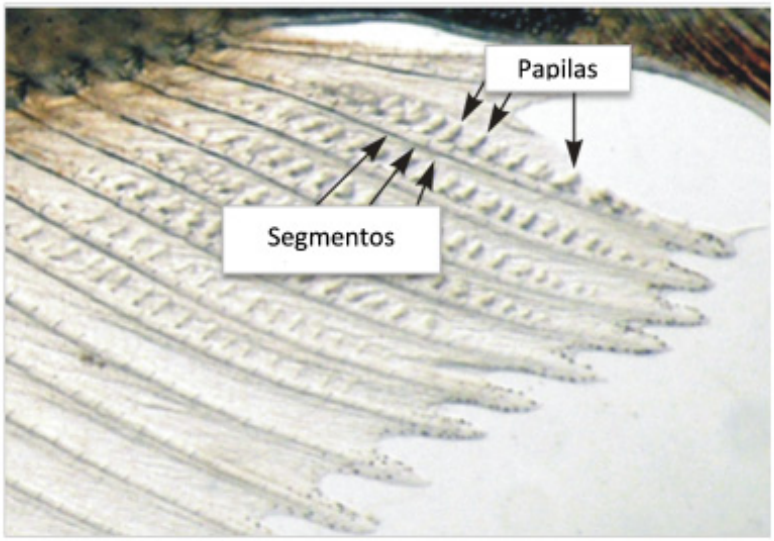
— Fijador (por ejemplo, el de Davidson; no se recomienda el de Bouin), si no se hace el recuento a partir de la imagen.

***Procedimientos***

Tras la autopsia, se toman imágenes de la aleta anal para permitir el adecuado recuento de las papilas de la aleta anal. Aunque la toma de imágenes es el método recomendado, puede fijarse la aleta anal con fijador de Davidson, o con otro fijador adecuado, durante aproximadamente un minuto. Es importante mantener plana la aleta anal durante la fijación para facilitar el recuento de las papilas. El cuerpo con la aleta anal puede conservarse en fijador de Davidson u otro fijador adecuado hasta que se analice. Se recuenta el número de segmentos (véase la figura 1) con papilas que sobresalen del margen posterior del segmento.

*Figura 1*

**Papilas de la aleta anal**



▼**M8**

*Apéndice 9*

CALENDARIO DETALLADO DEL MEOGRT

**Semanas de ensayo 1-3 (F0)**

Los peces de desove de la generación F0 que cumplen los criterios de selección (véanse los puntos 16-20) se exponen durante tres semanas para permitir que los gametos en desarrollo y los tejidos de las gónadas se expongan al producto problema. Cada uno de los recipientes replicados alberga una sola pareja de peces de cría (pareja de cría con hembra XX y macho XY). Se recogen y recuentan los huevos desovados y se evalúa su fertilidad durante 21 días consecutivos, empezando en el día de ensayo 1.

**Semana de ensayo 4 (F0 y F1)**

Es preferible que los huevos fertilizados y viables (embriones) se recojan en un solo día; no obstante, si no hay suficientes embriones, podrán recogerse durante dos días. Si se recogen a lo largo de dos días, todos los embriones incluidos dentro de los tratamientos que se hayan obtenido el primer día se agrupan con los recogidos el segundo día. A continuación, el total de embriones agrupados de cada tratamiento se distribuye aleatoriamente por cada una de las incubadoras replicadas en la proporción de 20 embriones por incubadora. La mortalidad de los huevos fertilizados (embriones) se comprueba y registra diariamente. Los huevos muertos se retiran de las incubadoras (la muerte en los huevos fertilizados puede observarse, sobre todo en las primeras fases, por una acusada pérdida de translucidez y un cambio de la coloración, debido a la coagulación o la precipitación de las proteínas, que conducen a un aspecto blanco opaco; OCDE, 2010).

Nota: Si alguno de los tratamientos necesita un segundo día de recogida, aunque sea uno solo, todos los tratamientos (incluidos los testigos) deberán seguir este procedimiento. Si, después del segundo día de recogida, no se dispone de un número suficiente de embriones dentro de un tratamiento para la carga de 20 embriones por incubadora, se reduce el número de embriones cargados dentro de ese tratamiento específico a 15 embriones por incubadora. Si no hay suficientes embriones para cargar 15 por incubadora, se reduce el número de incubadoras replicadas hasta que haya suficientes embriones para poner 15 por incubadora. Además, podrían añadirse más parejas de cría por tratamiento y testigo en F0 para producir más huevos, a fin de alcanzar la cifra recomendada de 20 por réplica.

En el día de ensayo 24, las parejas de cría de la F0 se sacrifican de forma compasiva y se registran el peso y la talla. Si es necesario, pueden conservarse parejas de cría de la F0 durante un período adicional de 1-2 días para reiniciar F1.

**Semanas de ensayo 5-6 (F1)**

Uno o dos días antes del inicio previsto de la eclosión, se detiene o reduce la agitación de los huevos en incubación para acelerar la eclosión. Según van eclosionando los embriones cada día, se agrupan por tratamiento y se distribuyen sistemáticamente por cada uno de los recipientes replicados de larvas dentro de un tratamiento específico con un máximo de doce animales eclosionados. Para ello se seleccionan aleatoriamente los animales eclosionados y se coloca uno solo de ellos en las sucesivas réplicas de forma indiscriminada, siguiendo un orden a lo largo de las réplicas del tratamiento específico, hasta que todas las réplicas dentro del tratamiento tengan doce animales eclosionados. Si no hay suficientes animales para completar todas las réplicas, ha de asegurarse que el mayor número posible de réplicas tiene doce animales para iniciar la fase F1.

Los huevos que no hayan eclosionado en un período del doble del día mediano de eclosión del testigo se consideran inviables y se desechan. Se registra el número de animales eclosionados y se calcula el éxito de la eclosión (capacidad de eclosión) en cada réplica.

▼M8

**Semanas de ensayo 7-11 (F1)**

Se comprueba y registra diariamente la supervivencia de las larvas en todas las réplicas. En el día de ensayo 43, se registra el número de peces supervivientes en cada réplica y el número inicial de animales eclosionados puestos en la réplica (en principio, doce). Esto permite calcular el porcentaje de supervivencia desde la eclosión hasta la fase de subadulto.

**Semana de ensayo 12 (F1)**

En el día de ensayo 78-85, se toma una pequeña muestra de la aleta caudal (es decir, se recorta un trozo de la aleta) de cada pez para determinar el sexo genotípico del individuo de todos los peces. Esta información se utiliza para establecer las parejas de cría.

Dentro de los tres días siguientes a la determinación del sexo genotípico de cada pez, se establecen doce parejas de cría por tratamiento y veinticuatro parejas por cada testigo. Se seleccionan al azar dos peces XX y XY de cada réplica y se agrupan por sexo y, a continuación, se seleccionan aleatoriamente para establecer una pareja de cría (es decir, una pareja XX-XY). Se establece un mínimo de doce réplicas por tratamiento con producto y un mínimo de veinticuatro réplicas por testigo con una pareja de cría por réplica. Si una réplica no tiene dos peces XX o dos peces XY para la agrupación, deben obtenerse peces con el genotipo sexual adecuado a partir de otras réplicas dentro del tratamiento.

El resto de los peces (máximo de ocho peces por réplica) se sacrifican de forma compasiva y se toman muestras en relación con los distintos parámetros de los subadultos. Se conservan los datos *dmy* (XX o XY) de todas las muestras de subadultos a fin de garantizar que todos los datos de los parámetros pueden relacionarse con el sexo genético de cada pez.

**Semanas de ensayo 13-14 (F1)**

La exposición continúa mientras las parejas de cría subadultas se van convirtiendo en adultas. En el día de ensayo 98 (es decir, el día anterior al inicio de la recogida de los huevos), se retiran los huevos tanto de los acuarios como de las hembras.

**Semanas de ensayo 15-17 (F1)**

Se recogen diariamente los huevos desovados durante veintiún días consecutivos en cada réplica, y se evalúan la fecundidad y la fertilidad.

**Semana de ensayo 18 (repetición de la semana de ensayo 4) (F1 y F2)**

En el día de ensayo 120, se recogen los huevos de cada recipiente de las réplicas por la mañana. Se evalúan los huevos recogidos, y los huevos fertilizados (con los filamentos eliminados) de cada una de las parejas de cría se agrupan por tratamiento y se distribuyen sistemáticamente por las cámaras de incubación de huevos en la proporción de veinte huevos fertilizados por incubadora. Las incubadoras pueden colocarse en «recipientes de incubación» separados que se establezcan para cada tratamiento o en el recipiente de la réplica que contendrá los animales tras la eclosión. Es preferible que los embriones se recojan en un solo día; no obstante, si no hay suficiente embriones, podrán recogerse durante dos días. Si se recogen a lo largo de dos días, todos los embriones dentro de los tratamientos que se hayan obtenido el primer día se agrupan con los recogidos el segundo día. A continuación, el total de embriones agrupados de cada tratamiento se distribuye aleatoriamente por cada una de las incubadoras replicadas en la proporción de veinte embriones por incubadora. Nota: Si alguno de los tratamientos necesita un segundo día de recogida, aunque sea uno solo, todos los tratamientos (incluidos los testigos) deberán seguir este procedimiento. Si, después del segundo día de recogida, no se dispone de un número suficiente de embriones dentro de un tratamiento para la carga de veinte embriones por incubadora, el número de embriones cargados dentro de ese tratamiento específico se

▼M8

reduce a quince embriones por incubadora. Si no hay suficiente embriones para cargar quince por incubadora, se reduce el número de incubadoras replicadas hasta que haya suficientes embriones para poner quince por incubadora.

En el día de ensayo 121 (o en el día de ensayo 122, para garantizar que la generación F2 ha empezado bien), las parejas de cría F1 se sacrifican de forma compasiva y se analizan en relación con los parámetros de adultos. Si es necesario, pueden conservarse parejas de cría F1 durante un período adicional de 1-2 días para reiniciar F2.

**Semanas de ensayo 19-20 (F2)**

Uno a dos días antes del inicio previsto de la eclosión, se detiene o reduce la agitación de los huevos en incubación para acelerar la eclosión. Si se pone fin al ensayo con la terminación de la eclosión de F2, se registra cada día el número de animales eclosionados, los cuales se desechan. (Se consideran inviables los embriones que no han eclosionado después de un período de incubación prolongado, definido como el doble del día mediano de eclosión del testigo).

▼M8

*Apéndice 10*

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los tipos de datos biológicos que se generan en el MEOGRT no son específicos de este y, salvo en el caso de los datos de histopatología, se han elaborado muchas metodologías estadísticas apropiadas para analizar adecuadamente datos similares en función de las características de los datos, incluida la normalidad, la homogeneidad de la varianza, si el diseño del estudio se presta a análisis de hipótesis o a análisis de regresión, ensayos paramétricos o no paramétricos, etc. En general, los análisis estadísticos propuestos siguen las recomendaciones de la OCDE para los datos de ecotoxicidad (OCDE 2006) y en la figura 2 se puede ver un diagrama de flujo relativo al análisis de datos del MEOGRT.

Se parte de la base de que, en la mayoría de los casos, los conjuntos de datos van a mostrar respuestas monótonas. Además, debe considerarse la posibilidad de utilizar una prueba estadística unilateral frente a una prueba estadística bilateral. A menos que exista un razonamiento biológico por el que se considere inadecuada una prueba unilateral, se sugiere utilizar estas pruebas unilaterales. Si bien en la siguiente sección se recomiendan determinadas pruebas estadísticas, si se elaboran métodos estadísticos más adecuados o más potentes para su aplicación a los datos específicos generados en el MEOGRT, esas pruebas estadísticas se utilizarían para aprovechar esas ventajas.

Los datos del MEOGRT deben analizarse por separado para cada sexo genotípico. Hay dos estrategias para analizar los datos de peces de sexo invertido (bien machos XX o bien hembras XY): 1) censurar todos los datos de los peces de sexo invertido en la totalidad del ensayo, excepto la prevalencia de la inversión de sexo en cada réplica; 2) dejar en el conjunto de datos los datos de todos los peces de sexo invertido y analizarlos sobre la base del genotipo.

**Datos de histopatología**

Los datos de histopatología se presentan como puntuaciones de intensidad que se evalúan utilizando un procedimiento estadístico recientemente desarrollado, la modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage por cortes (RSCABS, *Rao-Scott Cochrane-Armitage by Slices*) (Green *et al*., 2014). El ajuste de *Rao-Scott* mantiene información sobre la replicación del ensayo; el procedimiento *por cortes* incorpora la expectativa biológica de que las puntuaciones de intensidad tienden a aumentar con el aumento de las concentraciones de tratamiento. Para cada diagnóstico, el resultado del RSCABS especifica qué tratamientos presentan mayor prevalencia de histopatología que los testigos, y su nivel de intensidad asociado.

**Datos de la fecundidad**

Los análisis de los datos de la fecundidad consisten en una prueba de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra o de Williams para determinar los efectos del tratamiento, siempre que los datos sean compatibles con una relación concentración-respuesta monótona. Con una prueba de ajuste secuencial, todas las comparaciones se realizan al nivel de significación de 0,05 y no se realiza ningún ajuste por el número de comparaciones realizadas. Se espera que los datos sean compatibles con una relación concentración-respuesta monótona, pero esto puede verificarse, bien mediante la inspección visual de los datos, bien mediante la elaboración de contrastes lineales y cuadráticos de medias de tratamiento tras una transformación ordinal por rangos de los datos. A menos que el contraste cuadrático sea significativo y el contraste lineal no lo sea, se realiza la prueba de tendencia. De lo contrario, se utiliza la prueba de Dunnett para determinar los efectos del tratamiento si los datos se distribuyen normalmente con varianzas homogéneas. Si no se cumplen estos requisitos, se utiliza la prueba de Dunn con ajuste de Bonferroni-Holm. Todas las pruebas indicadas se realizan con independencia de cualquier prueba global F o Kruskal-Wallis. En la referencia OCDE 2006 se ofrecen más detalles.

▼M8

Pueden utilizarse métodos alternativos, como un modelo lineal generalizado con errores de Poisson para los recuentos de huevos (sin transformar), si está justificado estadísticamente (Cameron y Trividi, 2013). Si se utiliza un enfoque alternativo, se recomienda asesoramiento estadístico.

**Recuento diario de huevos dentro de una sola generación**

El modelo ANOVA viene dado por Y = Tiempo*Tiempo+Tratamiento + *Tratamiento + Tiempo*Tratamiento + *Tiempo*Tratamiento, con efectos aleatorios de Réplica(Generación*Tratamiento) y Tiempo*Réplica(Tratamiento), teniendo en cuenta componentes desiguales de la varianza de ambos tipos entre generaciones. Aquí «Tiempo» hace referencia a la frecuencia de recuento de los huevos (por ejemplo, día o semana). Se trata de un análisis de medidas repetidas, con las correlaciones entre observaciones de las mismas réplicas teniendo en cuenta el carácter de medidas repetidas de los datos.

Los principales efectos del tratamiento se prueban con la prueba de Dunnett (o Dunnet-Hsu) que se ajusta por el número de comparaciones. Es necesario aplicar ajustes por el efecto principal de la generación o el tiempo, ya que respecto a estos dos factores no existe un nivel de «testigo» y cada pareja de niveles es una comparación de posible interés. En el caso de estos dos efectos principales, si la prueba F para el efecto principal es significativa al nivel de 0,05, las comparaciones por parejas entre niveles de ese factor pueden someterse entonces a ensayo al nivel de 0,05 sin más ajuste.

El modelo incluye interacciones de dos y tres factores, de modo que un efecto principal para, por ejemplo, el tiempo, puede no ser significativo, aunque el tiempo tenga un impacto significativo en los resultados. Así, si una interacción de dos o tres factores en la que participa el tiempo es significativa al nivel de 0,05, se pueden aceptar sin más ajuste las comparaciones de niveles de tiempo al nivel de significación de 0,05.

A continuación están las pruebas F relativas a la significación del tratamiento dentro del tiempo, los llamados cortes en el cuadro de ANOVA. Si, por ejemplo, el corte para el tratamiento dentro de F1 y el tiempo 12 es significativo al nivel de 0,05, las comparaciones por parejas para el tratamiento dentro de F1 y el tiempo 12 pueden aceptarse sin más ajuste al nivel de 0,05. Se aplican declaraciones similares a las pruebas para el tiempo dentro de F1 y el tratamiento, y para la generación dentro del tiempo y el tratamiento.

Por último, en el caso de las comparaciones no incluidas en ninguna de las categorías anteriores, las comparaciones deben ajustarse a los valores p mediante el ajuste de Bonferroni-Holm. Puede encontrarse más información sobre los análisis de estos modelos en Hocking (1985) y Hochberg y Tamhane (1987).

Como alternativa, los datos brutos se registran y se presentan en el informe del estudio como la fecundidad (número de huevos) por réplica para cada día. Debe calcularse la media de las réplicas de los datos en bruto y después hay que aplicar una transformación de raíz cuadrada. Debe calcularse un ANOVA de un factor con las medias de las réplicas transformadas, seguido de contrastes de Dunnett. También puede ser útil inspeccionar visualmente los datos de fecundidad de cada tratamiento y/o réplica con un diagrama de dispersión que muestre los datos a lo largo del tiempo. Esto permitirá una evaluación informal de los efectos potenciales a lo largo del tiempo.

**Todos los demás datos biológicos**

Los análisis estadísticos se basan en la suposición de que, si la selección de las dosis es adecuada, los datos serán monótonos. Así pues, se supone que los datos son monótonos y su monotonía se evalúa formalmente mediante el uso de contrastes lineales y cuadráticos. Si los datos son monótonos, se recomienda una prueba de tendencia de Jonckheere-Terpstra con las medianas de las réplicas (según lo aconsejado en OCDE 2006). Si el contraste cuadrático es significativo y el contraste lineal no lo es, se considera que los datos son no monótonos.

▼**M8**

Si los datos son no monótonos, en particular debido a la reducción de la respuesta del tratamiento más elevado o de los dos tratamientos más elevados, debe considerarse la censura del conjunto de datos para que el análisis se lleve a cabo sin dichos tratamientos. Esta decisión deberá adoptarse con juicio profesional y todos los datos disponibles, especialmente los datos que indiquen toxicidad manifiesta a dichos niveles de tratamiento.

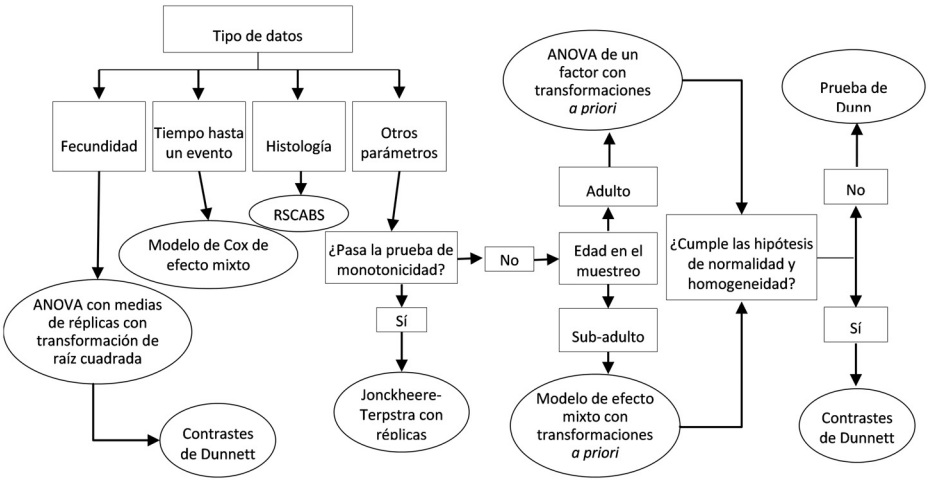
Por lo que respecta al peso y la longitud, no se recomiendan transformaciones, aunque ocasionalmente puedan ser necesarias. No obstante, se recomienda una transformación logarítmica para los datos de vitelogenina, una transformación de raíz cuadrada para los datos sobre los CSS (papilas de la aleta anal), y una transformación arcoseno de raíz cuadrada para los datos relativos a la proporción de la eclosión, al porcentaje de supervivencia, a la proporción de sexos y al porcentaje de huevos fértiles, El tiempo hasta la eclosión y el tiempo hasta el primer desove deben tratarse como datos de tiempo hasta un evento, y los distintos embriones que no eclosionan en el plazo definido o las réplicas en las que no hay desove se tratan como datos censurados por la derecha. El tiempo hasta la eclosión debe calcularse a partir del día mediano de eclosión de cada réplica. Estos parámetros deben analizarse utilizando un modelo de peligro proporcional de Cox de efecto mixto.

Los datos biológicos de las muestras de adultos tienen una medición por réplica, es decir, hay un pez XX y un pez XY por cada réplica de acuario. Por lo tanto, se recomienda efectuar un ANOVA de un factor con las medias de las réplicas. Si se cumplen las hipótesis del ANOVA (normalidad y homogeneidad de la varianza evaluadas con los valores residuales del ANOVA mediante la prueba de Shapiro-Wilks y la prueba de Levene, respectivamente), deben utilizarse contrastes de Dunnett para determinar qué tratamientos son diferentes del testigo. Por otra parte, si no se cumplen las hipótesis del ANOVA, debe realizarse una prueba de Dunn para determinar qué tratamientos son diferentes del testigo. Se recomienda un procedimiento similar para los datos en forma de porcentajes (fertilidad, eclosión y supervivencia).

Los datos biológicos de las muestras de subadultos tienen de 1 a 8 mediciones por réplica, es decir, puede haber números variables de individuos que contribuyen a la media de las réplicas respecto a cada sexo genotípico. Por lo tanto, se recomienda utilizar un modelo de ANOVA de efecto mixto, seguido por contrastes de Dunnett, si se cumplen las hipótesis de normalidad y homogeneidad de la varianza (con los valores residuales del ANOVA de efecto mixto). Si no se cumplen, debe realizarse una prueba de Dunn para determinar qué tratamientos son diferentes del testigo.

*Figura 2*

**Diagrama de flujo de los procedimientos estadísticos recomendados para el análisis de datos del MEOGRT.**



▼**M8**

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) OCDE (2014). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A guidance to application (annexes to this publication exist as a separate document), Publicaciones de la OCDE, París.

(2) Cameron AC and Trivedi PK (2013). Regression Analysis of Count Data, 2nd edition, Econometric Society Monograph No 53, Cambridge University Press.

(3) Hocking RR (1985). The Analysis of Linear Models, Monterey, CA: Brooks/Cole.

(4) Hochberg Y and Tamhane AC (1987). Multiple Comparison Procedures. John Wiley and Sons, New York.

▼M8

## C.53. ENSAYO DE CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LARVAS DE ANFIBIOS (LAGDA)

### INTRODUCCIÓN

1. El presente método es equivalente a las directrices de ensayo (TG) 241 de la OCDE (2015). La necesidad de elaborar y validar un ensayo que permita identificar y caracterizar las consecuencias negativas de la exposición a productos tóxicos en los anfibios procede de la preocupación de que los niveles medioambientales de productos puedan tener efectos adversos tanto en los seres humanos como en la vida silvestre. Las directrices de ensayo de la OCDE sobre el ensayo de crecimiento y desarrollo de larvas de anfibios (LAGDA, *Larval Amphibian Growth and Development Assay*) describen un ensayo de toxicidad con una especie anfibia que tiene en cuenta el crecimiento y el desarrollo a partir de la fertilización durante la fase temprana de juveniles. Se trata de un ensayo (normalmente de 16 semanas) que evalúa el desarrollo temprano, la metamorfosis, la supervivencia, el crecimiento y la maduración sexual parcial. También incluye la medición de un conjunto de otros parámetros que permite la evaluación diagnóstica de los productos sospechosos de alterar el sistema endocrino u otros tipos de sustancias tóxicas para el desarrollo y para la reproducción. El método descrito en este método de ensayo procede del trabajo de validación con la rana africana de uñas (*Xenopus laevis*) por parte de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (U.S. EPA) con apoyo de Japón (1). Aunque otras especies anfibias pueden adaptarse a un protocolo de ensayo de crecimiento y desarrollo con la capacidad de determinar el sexo genético como componente importante, los métodos específicos y los parámetros de observación detallados en este método de ensayo son aplicables únicamente a *Xenopus laevis*.

2. El LAGDA sirve como prueba de nivel superior con anfibios para recoger información más completa sobre la relación concentración-respuesta en cuanto a los efectos adversos, adecuada para su utilización en la identificación y caracterización de los peligros, así como en la evaluación del riesgo ecológico. El ensayo corresponde al nivel 4 del marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos, en el que los ensayos *in vivo* también proporcionan datos sobre efectos adversos en relación con parámetros pertinentes endocrinos (2). El diseño experimental general implica exponer embriones de *X. laevis* en la fase 8-10 de Nieuwkoop y Faber (NF) (3) a un mínimo de cuatro concentraciones diferentes de producto problema (por lo general espaciadas a intervalos al menos semilogarítmicos), además del testigo o testigos, hasta 10 semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 en el testigo, con una submuestra intermedia en la fase NF 62 [≤ 45 días tras la fertilización (dtf); normalmente unos 45 dtf]. Hay cuatro réplicas de cada concentración de ensayo y ocho réplicas del testigo. Los parámetros evaluados en el transcurso de la exposición (en la submuestra intermedia y en la muestra final al terminar el ensayo) incluyen los que son indicativos de toxicidad generalizada, como mortalidad, comportamiento anormal y determinaciones del crecimiento (longitud y peso), y también parámetros diseñados para caracterizar modos de acción específicos de toxicidad endocrina relacionados con procesos fisiológicos en los que participan estrógenos, andrógenos u hormonas tiroideas. El método hace hincapié principalmente en los posibles efectos pertinentes para la población (en particular, efectos adversos sobre la supervivencia, el desarrollo, el crecimiento y el desarrollo sexual) a fin de calcular una concentración sin efecto observado (NOEC) o una concentración con efecto del × % en el parámetro medido (cambio en ese porcentaje) (CEx). Aunque hay que señalar que los enfoques de CEx rara vez son adecuados para grandes estudios de este tipo, en los que puede ser poco práctico aumentar el número de concentraciones de ensayo para poder determinar la CEx deseada. También hay que señalar que el método no cubre la fase de reproducción en sí. Las definiciones utilizadas en el presente método se recogen en el apéndice 1.

### CONSIDERACIONES INICIALES Y LIMITACIONES

3. Debido al número limitado de productos sometidos a ensayo y de laboratorios implicados en la validación de este ensayo, que es bastante complejo, y en particular a que la reproducibilidad inter-laboratorios no está documentada

▼M8

por ahora con datos experimentales, se prevé que, cuando se disponga de un número suficiente de estudios para determinar el impacto de este nuevo diseño del estudio, se examinarán las directrices de ensayo 241 de la OCDE y, en caso necesario, se modificarán a la luz de la experiencia adquirida. El LAGDA es un ensayo importante para estudiar los posibles factores del declive de la población de anfibios, al evaluar los efectos de la exposición a los productos durante la fase larvaria sensible, en la que los efectos sobre la supervivencia y el desarrollo, incluido el desarrollo normal de los órganos sexuales, pueden afectar negativamente a la población.

4. El objetivo del ensayo es detectar un efecto o efectos principales resultantes de mecanismos tanto endocrinos como no endocrinos, e incluye parámetros de diagnóstico que son en parte específicos de modalidades endocrinas clave. Hay que señalar que, hasta que se elaboró el LAGDA, no había ningún ensayo validado que sirviera para alcanzar este objetivo con los anfibios.

5. Antes de iniciar el ensayo, es importante disponer de información sobre las propiedades fisicoquímicas del producto problema, en particular para permitir la obtención de soluciones estables del producto. También es necesario disponer de un método analítico suficientemente sensible para verificar las concentraciones del producto problema. Con una duración aproximada de 16 semanas, el ensayo requiere un total de 480 animales, es decir, embriones de *X. laevis*, (o 640 embriones, si se utiliza un control del disolvente) a fin de garantizarle una potencia suficiente para la evaluación de los parámetros pertinentes para la población, como el crecimiento, el desarrollo y la maduración sexual.

6. Antes de utilizar el método de ensayo con fines normativos en una mezcla hay que considerar si proporcionará resultados adecuados para la finalidad normativa en cuestión. Además, este ensayo no evalúa directamente la fecundidad, por lo que puede no ser aplicable para su uso en una fase más avanzada que el nivel 4 del marco conceptual de la OCDE para los ensayos y la evaluación de los alteradores endocrinos.

BASE CIENTÍFICA DEL MÉTODO DE ENSAYO

7. Gran parte de nuestra comprensión actual de la biología de los anfibios se ha obtenido utilizando la especie modelo de laboratorio, *X. laevis*. Esta especie puede cultivarse habitualmente en el laboratorio, la ovulación puede inducirse con gonadotropina coriónica humana (hCG) y pueden obtenerse fácilmente poblaciones de animales de los criadores comerciales.

8. Al igual que en todos los vertebrados, la reproducción en los anfibios está controlada por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HPG, *hypothalamic pituitary gonadal*) (4). Los estrógenos y los andrógenos son mediadores de este sistema endocrino, dirigiendo el desarrollo y la fisiología de tejidos sexualmente dimorfos. Hay tres fases distintas en el ciclo de vida de los anfibios en las que este eje está especialmente activo: 1) la diferenciación de las gónadas durante el desarrollo de las larvas, 2) el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la maduración de las gónadas durante la fase de juveniles, y 3) la reproducción funcional de los adultos. Cada una de estas tres ventanas de desarrollo puede ser susceptible de perturbación endocrina por algunos productos, como los estrógenos y los andrógenos, que, en última instancia, provocaría una pérdida de aptitud para la reproducción por parte de los organismos.

9. Las gónadas comienzan el desarrollo en la fase NF 43, cuando se forma por primera vez la cresta genital bipotencial. La diferenciación de las gónadas comienza en la fase NF 52 cuando las células germinales primordiales bien migran al tejido medular (machos) o bien permanecen en la región cortical

▼M8

(hembras) de las gónadas en desarrollo (3). De este proceso de diferenciación sexual de las gónadas de *Xenopus* se comunicó por primera vez en la década de 1950 que es susceptible de sufrir alteraciones por productos (5) (6). La exposición de los renacuajos al estradiol durante este período de diferenciación de las gónadas conduce a la inversión de sexo de los machos que, cuando llegan a la edad adulta, son hembras plenamente funcionales (7) (8). También es posible la inversión de sexo funcional de las hembras, que se convierten en machos, y se ha informado de ella a raíz de la implantación de tejido testicular enlos renacuajos (9). Sin embargo, aunque la exposición a un inhibidor de la aromatasa también provoca la inversión de sexo funcional en *X. tropicalis* (10), no se ha demostrado que esto ocurra en *X. laevis*. Históricamente, los efectos del producto tóxico sobre la diferenciación de las gónadas se han evaluado mediante el examen histológico de las gónadas en la metamorfosis y la inversión de sexo solo se ha podido determinar mediante el análisis de la proporción de sexos. Hasta hace poco, no había medios para determinar directamente el sexo genético de *Xenopus*. Sin embargo, el reciente establecimiento de marcadores relacionados con el sexo en *X. laevis* hace posible determinar el sexo genético y permite la identificación directa de animales con inversión de sexo (11).

10. En los machos, el desarrollo de los juveniles va de par con un aumento de los niveles sanguíneos de testosterona, lo que provoca el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, así como el de los testículos. En las hembras, los ovarios producen estradiol, lo que da lugar a la aparición de vitelogenina (VTG) en el plasma y de ovocitos vitelogénicos en los ovarios, y al desarrollo de oviductos (12). Los oviductos son caracteres sexuales secundarios femeninos que intervienen en la maduración de los ovocitos durante la reproducción. Se aplican capas de gelatina al exterior de los ovocitos según van pasando por el oviducto y se recogen en el ovisaco, listos para la fertilización. Se ve que el desarrollo del oviducto está regulado por estrógenos, ya que está correlacionado con los niveles sanguíneos de estradiol en *X. laevis* (13) y *X. tropicalis* (12). Se ha comunicado el desarrollo de oviductos en machos tras la exposición a policlorobifenilos (14) y a 4-*terc*-octilfenol (15).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

11. El diseño experimental implica exponer embriones de *X. laevis* en la fase NF 8-10 (3) por la vía del agua a cuatro concentraciones diferentes de producto problema, además del testigo o testigos, hasta 10 semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 en el testigo, con una submuestra intermedia en la fase NF 62. Aunque también cabe la posibilidad de administrar productos muy hidrófobos por la vía de los alimentos, hasta la fecha ha habido poca experiencia con esa vía de exposición en este ensayo. Hay cuatro réplicas de cada concentración de ensayo y ocho réplicas de cada testigo. Entre los parámetros evaluados en el transcurso de la exposición se incluyen los que indican toxicidad generalizada [es decir, mortalidad, comportamiento anormal y determinaciones del crecimiento (longitud y peso)], así como parámetros diseñados para caracterizar modos de acción específicos de toxicidad endocrina relacionados con procesos fisiológicos en los que participan estrógenos, andrógenos u hormonas tiroideas [es decir, histopatología de la tiroides, histopatología de las gónadas y sus conductos, desarrollo anormal, vitelogenina plasmática, vitelogenina del plasma (opcional) y proporción de sexos genotípicos/fenotípicos].

CRITERIOS DE VALIDEZ DEL ENSAYO

12. Se aplican los siguientes criterios de validez del ensayo:

— La concentración de oxígeno disuelto ha de ser ≥ 40 % del valor de saturación en el aire a lo largo de todo el ensayo;

▼**M8**

— La temperatura del agua debe estar en el intervalo de 21 °C ± 1 °C y la diferencia entre réplicas y entre tratamientos no debe superar el valor de 1,0 °C;

— El pH de la solución de ensayo debe mantenerse entre 6,5 y 8,5, y la diferencia entre réplicas y entre tratamientos no debe ser superior a 0,5;

— Debe disponerse de pruebas para demostrar que las concentraciones del producto problema en la solución se han mantenido satisfactoriamente dentro del intervalo de ± 20 % de la media de los valores medidos;

— La mortalidad durante el período de exposición debe ser ≤ 20 % en cada réplica de los testigos;

— La viabilidad ha de ser ≥ 70 % en el desove elegido para iniciar el estudio;

— El tiempo mediano hasta la fase NF 62 de los testigos debe ser ≤ 45 días;

— El peso medio de los organismos de ensayo en la fase NF 62 y al final del ensayo en los testigos y, en su caso, en los controles del disolvente debe alcanzar 1,0 ± 0,2 y 11,5 ± 3 g, respectivamente.

13. Aunque no es un criterio de validez, se recomienda que se disponga para su análisis de al menos tres niveles de tratamiento con tres réplicas no alteradas. Una mortalidad excesiva, que altere un tratamiento, se define como > 4 muertes (> 20 %) en dos o más réplicas que no se puedan explicar por un error técnico. Debe disponerse para su análisis de al menos tres niveles de tratamiento sin toxicidad manifiesta evidente. Los signos de toxicidad manifiesta pueden incluir, entre otras cosas, flotar en la superficie, tumbarse en el fondo del recipiente, nadar de forma invertida o irregular, dejar de subir a la superficie y no ser sensible a estímulos, o presentar anomalías morfológicas (p. ej., deformidades de las extremidades), lesiones hemorrágicas y edema abdominal.

14. En caso de que se observe una desviación de los criterios de validez del ensayo, se deben tener en cuenta las consecuencias en relación con la fiabilidad de los datos del ensayo y dichas desviaciones y consideraciones deben incluirse en el informe del ensayo.

DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS

**Equipo**

15. Se emplea el equipo común de laboratorio y, en particular:

a) aparatos de ajuste de la temperatura (por ejemplo, calefactores o enfriadores, ajustables a 221 ± 1 °C);

▼M8

b) termómetro;

c) microscopio de disección binocular y herramientas de disección;

d) cámara digital con un mínimo de 4 megapíxeles de resolución y apta para su uso en microscopía (en caso necesario);

e) balanza analítica capaz de pesar con precisión de 0,001 mg o 1 μg;

f) medidor de oxígeno disuelto y pHmetro;

g) medidor de la intensidad de la luz capaz de medir en unidades lux.

**Agua**

*Fuente y calidad*

16. Puede utilizarse cualquier agua de dilución de la que se disponga localmente (p. ej., agua de manantial o agua del grifo pasada por filtro de carbón) y que permita el crecimiento y el desarrollo normales de *X. laevis*; debe disponerse de pruebas de crecimiento normal en esta agua. Como la calidad del agua local puede variar considerablemente de una zona a otra, debe analizarse, en particular si no se dispone de datos históricos sobre la adecuación del agua para criar larvas de anfibios. Antes de iniciar el ensayo y/o, por ejemplo, cada seis meses cuando se sepa que el agua de dilución es de calidad relativamente constante, se debe proceder a la determinación de los metales pesados (p. ej., Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), de los aniones y cationes principales (p. ej., $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $Na^{+}$, $K^{+}$, $Cl^{-}$, $SO_4^{2-}$), plaguicidas, carbono orgánico total y sólidos en suspensión. En el apéndice 2 se recogen algunas características químicas de un agua de dilución aceptable.

*Concentración de yoduro en el agua del ensayo*

17. Con el fin de que la glándula tiroidea sintetice las hormonas tiroideas que permiten la metamorfosis normal, es necesario que las larvas tengan acceso a suficiente yoduro mediante una combinación de fuentes acuosas y dietéticas. En la actualidad no existen directrices basadas en datos empíricos sobre concentraciones mínimas de yoduro en los alimentos o en el agua para garantizar un desarrollo adecuado. No obstante, la disponibilidad de yoduro puede afectar a la capacidad de respuesta del sistema tiroideo ante los agentes con actividad tiroidea, y se sabe que modula la actividad basal de la glándula tiroidea, aspecto que merece atención a la hora de interpretar los resultados histopatológicos de la glándula. Según trabajos previos, se ha visto que el comportamiento del ensayo es adecuado cuando las concentraciones de yoduro ($I^{-}$) en el agua de dilución varían entre 0,5 y 10 μg/l. Lo ideal es que la concentración mínima de yoduro en el agua de dilución a lo largo de todo el ensayo sea de 0,5 μg/l (añadido como sal de sodio o de potasio). Si el agua del ensayo se ha reconstituido a partir de agua desionizada, debe añadirse yodo a una concentración mínima de 0,5 μg/l. Deben indicarse las concentraciones medidas de yoduro del agua del ensayo (es decir, del agua de dilución) y el complemento de yodo u otras sales (en su caso) añadido al agua del ensayo. El contenido de yodo puede medirse también en los alimentos, además de en el agua del ensayo.

**Sistema de exposición**

18. El ensayo se ha desarrollado con un sistema de diluyente dinámico. Los componentes del sistema que estén en contacto con el agua deben estar hechos de vidrio, acero inoxidable u otros materiales químicamente inertes. Los recipientes de exposición deben ser acuarios de vidrio o de acero inoxidable, y su volumen utilizable debe estar entre 4,0 y 10,0 l (con una profundidad mínima del agua de 10 a 15 cm). El sistema debe ser capaz de soportar todas las concentraciones de exposición, un testigo y un control del disolvente, en caso necesario, con cuatro réplicas por tratamiento y ocho en el caso de los testigos. El caudal de cada recipiente debe ser constante, teniendo en cuenta tanto el mantenimiento de las condiciones biológicas

▼M8

como la exposición al producto. Se recomienda que los caudales sean adecuados (por ejemplo, al menos cinco renovaciones del volumen del recipiente por día) para evitar un descenso de la concentración del producto por el metabolismo tanto de los organismos de ensayo como de los microorganismos acuáticos presentes en los acuarios o por vías abióticas de degradación (hidrólisis, fotólisis) o disipación (volatilización, sorción). A los recipientes de tratamiento se les debe asignar aleatoriamente una posición en el sistema de exposición para reducir los posibles efectos posicionales, incluyendo ligeras variaciones de temperatura, intensidad de la luz, etc. Para obtener más información sobre la configuración de sistemas de exposición dinámica, consúltese la Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians de la ASTM (16).

**Distribución del producto: preparación de las soluciones de ensayo**

19. Para realizar las soluciones de ensayo en el sistema de exposición, la solución del producto problema debe administrarse al sistema de exposición mediante una bomba adecuada u otro aparato. El caudal de la solución madre debe calibrarse de acuerdo con la confirmación analítica de las soluciones problema antes del inicio de la exposición, y comprobarse volumétricamente con regularidad durante el ensayo. La solución de ensayo de cada cámara debe ser objeto como mínimo de cinco renovaciones de volumen al día.

20. El método utilizado para introducir el producto problema en el sistema puede variar en función de sus propiedades fisicoquímicas. Por tanto, antes del ensayo debe obtenerse la información de referencia sobre el producto que sea pertinente para determinar su capacidad de someterse al ensayo. Entre la información útil sobre las propiedades específicas del producto problema se incluyen la fórmula estructural, el peso molecular, la pureza, la estabilidad en el agua y ante la luz, el $pK_a$ y el $K_{ow}$, la solubilidad en el agua (preferiblemente en el medio de ensayo) y la presión de vapor, así como los resultados de un ensayo de biodegradabilidad fácil [método de ensayo C.4 (17) o C.29 (18)]. La solubilidad y la presión de vapor pueden utilizarse para calcular la constante de la ley de Henry, que indicará si se van a producir pérdidas debido a la evaporación del producto problema. La realización de este ensayo sin la información indicada más arriba debe considerarse cuidadosamente, ya que el diseño del estudio depende de las propiedades fisicoquímicas del producto problema y, sin esos datos, los resultados del ensayo pueden ser difíciles de interpretar o incluso carecer de sentido. Para cuantificar el producto problema en las soluciones del ensayo, debe disponerse de un método analítico fiable, cuyo límite de detección y cuya exactitud sean conocidos y se hayan comunicado. Los productos hidrosolubles pueden disolverse en alícuotas de agua de dilución a una concentración que permita su suministro a la concentración objetivo del ensayo en un sistema dinámico. Los productos líquidos o sólidos a temperatura ambiente y moderadamente hidrosolubles pueden requerir el uso de una columna de saturación líquido:líquido o líquido:sólido (por ejemplo, columna de lana de vidrio) (19). Aunque también cabe la posibilidad de administrar productos problema muy hidrófobos por la vía de los alimentos, hasta la fecha ha habido poca experiencia con esa vía de exposición en este ensayo.

21. Las soluciones de ensayo a las concentraciones elegidas se preparan por dilución de una solución madre. La solución madre se prepara preferiblemente por simple mezcla o agitación del producto problema en el agua de dilución con medios mecánicos (por ejemplo, mediante un agitador o ultrasonidos). Para lograr la concentración adecuada de la solución madre pueden emplearse columnas o sistemas de saturación o métodos de administración pasiva (20). Lo preferible es utilizar un sistema de ensayo sin cosolventes; sin embargo, los distintos productos problema tendrán propiedades fisicoquímicas diversas que probablemente requerirán enfoques diferentes para la preparación del agua de exposición al producto. Deben hacerse todos los

▼M8

esfuerzos posibles para evitar tener que recurrir a disolventes o vehículos: 1) el uso de determinados disolventes puede desembocar en toxicidad o en respuestas indeseables o imprevistas; 2) la concentración de productos problema por encima de su hidrosolubilidad (como puede ocurrir con frecuencia si se utilizan disolventes) puede hacer que sean inexactas las determinaciones de las concentraciones efectivas; 3) el uso de disolventes en ensayos a largo plazo puede dar lugar a la formación de «biopelícula» en un grado significativo, asociada con una actividad microbiana que puede afectar a las condiciones medioambientales, así como a la capacidad de mantener las concentraciones de exposición, y 4) a falta de datos históricos que demuestren que el disolvente no influye en los resultados del estudio,el uso de disolventes impone la realización de un control del disolvente con implicaciones para el bienestar de los animales, ya que han de utilizarse más animales para llevar a cabo el ensayo. En caso de productos difíciles de ensayar, es posible utilizar un disolvente como último recurso, y debe consultarse el documento de orientación de la OCDE sobre ensayos de toxicidad acuática con sustancias y mezclas difíciles (Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures) (21). La elección del disolvente debe venir determinada por las propiedades químicas del producto problema y por la disponibilidad de datos históricos de testigos del disolvente. A falta de datos históricos, debe determinarse la idoneidad de un disolvente antes de realizar el estudio definitivo. En caso de que sea inevitable la utilización de un disolvente, y de que se encuentre actividad microbiana (biopelícula), se recomienda registrar/comunicar la formación de biopelícula por recipiente (al menos una vez por semana) a lo largo de todo el ensayo. Lo ideal es que la concentración de disolvente se mantenga constante en el control del disolvente y en todos los tratamientos de ensayo. Si la concentración del disolvente no se mantiene constante, en el control de disolvente debe utilizarse la mayor concentración de disolvente que se encuentre en el tratamiento de ensayo. En los casos en que se utilicen vehículos disolventes, las concentraciones máximas de disolvente no deben superar los 100 µl/l o 100 mg/l (21), y se recomienda mantener la concentración de disolvente lo más baja posible (p. ej., 20 µl/l) para evitar cualquier posible efecto del disolvente sobre los parámetros medidos (22).

**Animales de experimentación**

*Especie de ensayo*

22. La especie de ensayo es *X. laevis* por los siguientes motivos: 1) se cultiva habitualmente en laboratorios de todo el mundo, 2) puede obtenerse fácilmente a través de proveedores comerciales y 3) es posible determinar su sexo genético.

*Cría y cuidado de los adultos*

23. La cría y el cuidado de *X. laevis* se describen en unas directrices normalizadas (23). El alojamiento y el cuidado de *X. laevis* los describe también Read (24). Para inducir la reproducción, de tres a cinco parejas de hembras y machos adultos reciben por inyección intraperitoneal gonadotropina coriónica humana (hCG). Se administran a especímenes femeninos y masculinos, por ejemplo, unas 800-1 000 UI y 500-800 UI, respectivamente, de hCG disuelta en solución salina al 0,6-0,9 % (o en solución de Ringer para ranas, que es una solución salina isotónica para uso con anfibios). Los volúmenes de inyección deben ser de aproximadamente 10 µl/g de peso corporal (~ 1 000 µl). A continuación, las parejas de cría se mantienen en grandes recipientes, sin alteraciones y en condiciones estáticascon el objeto de fomentar el amplexo. El fondo de cada recipiente de cría debe tener un fondo falso de malla de acero inoxidable (p. ej., aberturas de 1,25 cm) que permita que los huevos caigan al fondo del recipiente. Normalmente, las ranas a las que se haya inyectado la hCG a última hora de la tarde depositarán la mayor parte de sus huevos a media mañana del día siguiente. Cuando se haya liberado y fertilizado una cantidad suficiente de huevos, deben retirarse los adultos de los recipientes de cría. A continuación, se recogen los huevos y se eliminan las capas de gelatina mediante tratamiento con L-cisteína (23). Hay que preparar una solución de L-cisteína al 2 % y ajustar su pH a 8,1 con NaOH 1 M. Esta solución a 21 °C se añade a un Erlenmeyer de 500 ml que contiene los huevos de un único desove y se agita moviendo suavemente de

▼M8

forma circular el recipiente durante uno o dos minutos y a continuación se enjuaga a fondo entre 6 y 8 veces con agua de cultivo a 21 °C. A continuación, se transfieren los huevos a un cristalizador y se determina si su viabilidad es > 70 % con anomalías mínimas en los embriones que muestran división celular.

DISEÑO DEL ENSAYO

**Concentraciones de ensayo**

24. Se recomienda utilizar un mínimo de cuatro concentraciones del producto y los testigos adecuados (incluidos los controles del disolvente, en caso necesario). En general, se recomienda espaciar las concentraciones con un factor de separación inferior o igual a 3,2.

25. A efectos del presente ensayo, los resultados de los estudios existentes con anfibios deben utilizarse, en la medida de lo posible, para determinar la mayor concentración de ensayo a fin de evitar concentraciones manifiestamente tóxicas. Puede contribuir a establecer esta concentración la información procedente de, por ejemplo, las relaciones cuantitativas estructura/actividad, la extrapolación y los datos de estudios existentes con anfibios, como el ensayo sobre metamorfosis de anfibios [método de ensayo C.38 (25)] y el ensayo de teratogénesis con embriones de rana - *Xenopus* (23), y/o ensayos con peces, como los métodos de ensayo C.48, C.41 y C.49 (26) (27) (28). Antes de la realización del LAGDA puede llevarse a cabo un experimento de determinación del intervalo. Se recomienda que la exposición para determinar el intervalo se inicie en el plazo de 24 horas desde la fertilización y se continúe durante 7-14 días (o más, si es necesario), y que las concentraciones de ensayo se fijen de tal manera que la separación entre ellas no sea superior a un factor de 10. Los resultados del experimento de determinación del intervalo deben servir para fijar la concentración de ensayo más elevada en el LAGDA. Téngase en cuenta que, si hay que utilizar un disolvente, la idoneidad del disolvente (es decir, si puede afectar al resultado del estudio) podría determinarse como parte del estudio de determinación del intervalo.

**Réplicas dentro de los grupos de tratamiento y testigos**

26. Debe utilizarse un mínimo de cuatro recipientes replicados por concentración de ensayo y un mínimo de ocho réplicas de los testigos (y el control del disolvente, en caso necesario) (es decir, el número de réplicas de los testigos y del eventual control del disolvente debe ser el doble del número de réplicas de cada grupo de tratamiento, con el fin de garantizar una potencia estadística adecuada). Cada réplica debe contener un máximo de 20 animales. El número mínimo de animales manejados sería de 15 (5 para la submuestra de la fase NF 62 y 10 juveniles). No obstante, se añaden animales adicionales a cada réplica para tener en cuenta la posibilidad de mortalidad, manteniendo al mismo tiempo el número crítico de 15.

PROCEDIMIENTO

**Resumen del procedimiento**

27. El ensayo se inicia con embriones recién desovados (fase NF 8-10) y continúa en la fase de desarrollo de los juveniles. Los animales se examinan diariamente para observar si hay mortalidad y signos de comportamiento anómalo. En la fase NF 62 se recoge una submuestra de larvas (de hasta 5 animales por réplica) y se examinan varios parámetros (cuadro 1). Después de que todos los animales hayan alcanzado la fase NF 66, es decir, la finalización de la metamorfosis (o 70 días después de la iniciación del

▼M8

ensayo, si esta fecha es anterior), se hace un sacrificio parcial al azar (pero sin submuestreo) para reducir el número de animales (10 por recipiente) (véase el punto 43), y los demás animales siguen adelante con la exposición hasta 10 semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 del testigo. A la terminación del ensayo (muestreo de juveniles) se efectúan mediciones adicionales (cuadro 1).

**Condiciones de exposición**

28. En el apéndice 3 figura un resumen completo de los parámetros del ensayo. Durante el período de exposición, deben medirse diariamente el oxígeno disuelto, la temperatura y el pH de las soluciones de ensayo. La conductividad, la alcalinidad y la dureza se miden una vez al mes. En cuanto a la temperatura del agua de las soluciones de ensayo, las diferencias entre réplicas y entre tratamientos (dentro del mismo día) no deben superar el valor de 1,0 °C. Asimismo, en cuanto al pH de las soluciones de ensayo, las diferencias entre réplicas y entre tratamientos no deben ser superiores a 0,5.

29. De los recipientes de exposición se pueden retirar cada día mediante un sifón los alimentos no consumidos y los productos residuales, teniendo cuidado de evitar la contaminación cruzada de los recipientes. Debe procurarse reducir al mínimo el estrés y los traumatismos causados a los animales, en particular durante los traslados, la limpieza de los acuarios y la manipulación. Deben evitarse las condiciones o actividades estresantes, como el ruido fuerte o incesante, los golpes en los acuarios y las vibraciones en los recipientes.

**Duración de la exposición al producto problema**

30. La exposición se inicia con embriones recién desovados (fase NF 8-10) y continúa hasta diez semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 ($\leq$ 45 días desde el inicio del ensayo) en el grupo testigo. En general, la duración del LAGDA es de 16 semanas (17 semanas como máximo).

**Inicio del ensayo**

31. Los animales parentales utilizados para el inicio del ensayo deberán haber demostrado previamente que consiguen descendientes cuyo sexo puede ser genéticamente asignado (apéndice 5). Después de que los adultos hayan desovado, los embriones se recogen, se tratan con cisteína para eliminar la capa de gelatina y se someten a cribado según su viabilidad (23). El tratamiento con cisteína permite que los embriones sean manipulados durante el cribado sin adherirse a las superficies. El cribado se lleva a cabo bajo un microscopio de disección, utilizando una pipeta de tamaño adecuado para retirar los embriones inviables. Es preferible utilizar para el ensayo un único desove que dé lugar a una viabilidad superior al 70 %. Los embriones en la fase NF 8-10 se distribuyen aleatoriamente en recipientes de tratamiento de exposición que contengan un volumen adecuado de agua de dilución hasta que cada recipiente contenga 20 embriones. Los embriones deben tratarse con cuidado durante este traslado para minimizar el estrés por manipulación y evitar lesiones. Al cabo de 96 horas después de la fertilización, los renacuajos deben haber subido por la columna de agua y comenzado a pegarse a los laterales del recipiente.

**Régimen de alimentación**

32. El cambio del tipo y de la dosis de la alimentación durante las diferentes etapas de la vida de *X. laevis* es un aspecto muy importante del protocolo del LAGDA. Una alimentación excesiva durante la fase larvaria suele dar lugar a un aumento de la incidencia de escoliosis y de su gravedad (apéndice 8), y debe evitarse. Por el contrario, una alimentación inadecuada durante la fase larvaria da lugar a unas tasas de desarrollo muy variables entre los testigos,

▼M8

lo que podría poner en peligro la potencia estadística o confundir los resultados de los ensayos. En el apéndice 4 se facilitan la dieta recomendada y los regímenes alimentarios para *X. laevis* en condiciones dinámicas, pero son admisibles otras posibilidades siempre que los organismos de ensayo crezcan y se desarrollen de forma satisfactoria. Es importante señalar que, si se miden parámetros específicos del sistema endocrino, los alimentos deben estar exentos de sustancias activas sobre este sistema, como es la harina de soja.

*Alimentación de las larvas*

33. La dieta recomendada para las larvas consiste en alimento inicial para truchas, discos del alga *Spirulina* y copos para peces de colores (por ejemplo, TetraFin®, de Tetra, Alemania) mezclados en agua de cultivo (o de dilución). Esta mezcla se administra tres veces al día en días laborables y una vez al día los fines de semana. Los renacuajos también se alimentan con nauplios de 24 h de edad de artemia salina, *Artemia* spp., dos veces al día en días laborables y una vez al día en los fines de semana, a partir del día 8 tras la fertilización. La alimentación de las larvas, que debe ser la misma en cada recipiente de ensayo, ha de permitir un crecimiento y un desarrollo adecuados de los animales de ensayo, a fin de garantizar la reproducibilidad y transferibilidad de los resultados del ensayo: 1) el tiempo mediano hasta la fase NF 62 en los testigos debe ser $\leq$ 45 días y 2) es recomendable un peso medio de 1,0 ± 0,2 g en la fase NF 62 en los testigos.

*Alimentación de los juveniles*

34. Una vez que se haya completado la metamorfosis, el régimen de alimentación consiste en comida sumergible de alta calidad para ranas, por ejemplo Sinking Frog Food -3/32 (Xenopus Express, Florida, EE. UU.). En el caso de las ranas jóvenes (fases tempranas de juveniles), los copos se pasan brevemente por un molinillo de café o batidora, o se trituran en un mortero para reducir su tamaño. Una vez que los juveniles son lo suficientemente grandes para consumir copos enteros, ya deja de ser necesario triturarlos o molerlos. Los animales deben recibir el alimento una vez al día. La alimentación de los juveniles debe permitir el crecimiento y desarrollo adecuados de los organismos: se recomienda un peso medio de 11,5 ± 3 g en los juveniles del testigo al término del ensayo.

**Química analítica**

35. Antes del inicio del ensayo, deben determinarse la estabilidad del producto problema (p. ej., solubilidad, degradabilidad y volatilidad) y todos los métodos analíticos necesarios, por ejemplo utilizando la información o los conocimientos existentes. Cuando se administre el producto a través del agua de dilución, se recomienda analizar las soluciones de ensayo de cada recipiente en paralelo antes del inicio del ensayo para verificar el comportamiento del sistema. Durante el período de exposición, las concentraciones del producto problema se determinan a intervalos apropiados, de preferencia cada semana al menos en una réplica de cada grupo de tratamiento, rotando cada semana entre las réplicas del mismo grupo de tratamiento. Se recomienda basar los resultados en las concentraciones medidas. Sin embargo, si la concentración de producto problema en la solución se ha mantenido debidamente dentro del ± 20 % de la concentración nominal durante todo el ensayo, los resultados pueden basarse tanto en los valores nominales como en los valores medidos. Asimismo, el coeficiente de variación (CV) de la concentración de ensayo medida durante todo el período de ensayo dentro de un tratamiento debe ser igual o inferior al 20 % en cada concentración. Cuando las concentraciones medidas no se mantengan en el intervalo del 80-120 % de la concentración nominal (por ejemplo, cuando se someten a ensayo productos muy biodegradables o adsorbentes), las concentraciones con efecto deben determinarse y expresarse en relación con la media aritmética de la concentración en los ensayos dinámicos.

▼M8

36. A lo largo de toda la duración de la exposición, los caudales de agua de dilución y de solución madre deben comprobarse a intervalos apropiados (por ejemplo, tres veces por semana). En el caso de los productos que no pueden detectarse a alguna de las concentraciones nominales o a todas ellas (por ejemplo, debido a una rápida degradación o adsorción en los recipientes de ensayo, o a la marcada acumulación del producto en los cuerpos de los animales expuestos), se recomienda que la tasa de renovación de la solución de ensayo en cada cámara se adapte para mantener las concentraciones de ensayo lo más constantes posible.

**Observaciones y medición de los parámetros**

37. Los parámetros evaluados en el transcurso de la exposición son los indicativos de toxicidad, incluida la mortalidad, el comportamiento anormal, como los signos clínicos de enfermedad y/o la toxicidad general, y las determinaciones del crecimiento (longitud y peso), así como los parámetros de histopatología que puedan responder tanto a la toxicidad general como a los modos de acción endocrinos relacionados con rutas en las que participan estrógenos, andrógenos u hormonas tiroideas. Además, se puede medir opcionalmente la concentración plasmática de VTG al término del ensayo. La medición de la VTG puede ser útil para comprender los resultados del estudio en el contexto de los mecanismos endocrinos en relación con alteradores endocrinos sospechosos. Los parámetros y el calendario de las mediciones se resumen en el cuadro 1.

*Cuadro 1*

**Resumen de los parámetros del LAGDA**

| Parámetros (*) | Cada día | Muestreo intermedio (muestreo de larvas) | Terminación del ensayo (muestreo de juveniles) |
|---|---|---|---|
| Mortalidad y anomalías | X | | |
| Tiempo hasta la fase NF 62 | | X | |
| Histo(pato)logía (glándula tiroidea) | | X | |
| Morfometría (crecimiento en peso y longitud) | | X | X |
| Índice hepatosomático (IHS) | | | X |
| Proporción de sexos genéticos/fenotípicos | | | X |
| Histopatología (gónadas, conductos genitales, riñón e hígado) | | | X |
| Vitelogenina (VTG) (opcional) | | | X |

(*) Se analizan todos los parámetros estadísticamente.

**Mortalidad y observaciones diarias**

38. Cada día hay que comprobar si hay animales muertos en todos los recipientes del ensayo; las cifras de muertes de cada recipiente deben quedar registradas. Los animales muertos deben extraerse del recipiente del ensayo en cuanto se observen. La fase de desarrollo de los animales muertos debe clasificarse, bien como anterior a la fase NF 58 (antes de la aparición de las patas delanteras), fase NF 58 - fase NF 62, fase NF 63 - fase NF 66 (entre la fase NF 62 y la absorción completa de la cola), o bien tras la fase NF 66 (posterior a la etapa larvaria). Las tasas de mortalidad que superen el 20 % podrían indicar unas condiciones incorrectas del ensayo o efectos manifiestamente tóxicos del producto problema. Los animales suelen ser

▼M8

más sensibles a la mortalidad no inducida por el producto durante los primeros días de desarrollo tras el desove y durante el apogeo de la metamorfosis. Esta mortalidad podría mostrarse en los datos de los testigos.

39. Además, deben registrarse las eventuales observaciones de comportamiento anormal, malformaciones macroscópicas visibles (p. ej., escoliosis) o lesiones. Las observaciones de escoliosis deben contabilizarse (incidencia) y clasificarse con respecto a la gravedad (por ejemplo, no relevante - NR, mínima - 1, moderada - 2, grave - 3; apéndice 8). Deben hacerse esfuerzos para garantizar que durante todo el estudio sea limitada la prevalencia de la escoliosis moderada y grave (por ejemplo, por debajo del 10 % en los testigos), si bien una prevalencia mayor de las anomalías en los testigos no sería necesariamente razón para detener el ensayo. El comportamiento normal de las larvas se caracteriza por su suspensión en la columna de agua con la cola elevada por encima de la cabeza, el movimiento regular y rítmico de la aleta caudal, la subida periódica a la superficie, la formación del opérculo y la respuesta ante estímulos. Entre los comportamientos anómalos se incluiría, por ejemplo, flotar en la superficie, quedarse en el fondo del recipiente, nadar de forma inversa o irregular, no subir a la superficie y no presentar respuesta ante estímulos. En el caso de los animales postmetamórficos, además de los comportamientos anómalos recién citados, deben registrarse las diferencias marcadas en el consumo de alimentos entre los distintos grupos de tratamiento. Las malformaciones y lesiones macroscópicas podrían incluir anomalías morfológicas (por ejemplo, deformidades de las extremidades), lesiones hemorrágicas, edema abdominal, e infecciones bacterianas o fúngicas, entre otras. La presencia de lesiones en la cabeza de los juveniles, justo detrás de las narinas, puede ser indicio de niveles insuficientes de humedad. Estas determinaciones son cualitativas, deben considerarse similares a las manifestaciones clínicas de enfermedad o estrés, y efectuarse en comparación con los animales testigo. Si la tasa de incidencia es mayor en los recipientes expuestos que en los testigos, se debe considerar como prueba de toxicidad manifiesta.

**Submuestreo de larvas**

*Esquema del muestreo de larvas:*

40. Los renacuajos que hayan alcanzado la fase NF 62 deben retirarse de los recipientes y ser objeto de muestreo o pasarse para la parte siguiente de la exposición a un depósito nuevo, o separarse físicamente de los renacuajos restantes en el mismo recipiente con un separador. Los renacuajos se observan diariamente y se anota el día del estudio en que un renacuajo concreto alcanza la fase NF 62. La característica definitoria que debe utilizarse en esta evaluación es la forma de la cabeza. Una vez que la cabeza se ha reducido en tamaño de tal modo que a la vista su anchura es aproximadamente la misma que la del tronco del renacuajo y las extremidades anteriores al nivel del centro del corazón, entonces se considerará que ese animal ha alcanzado la fase NF 62.

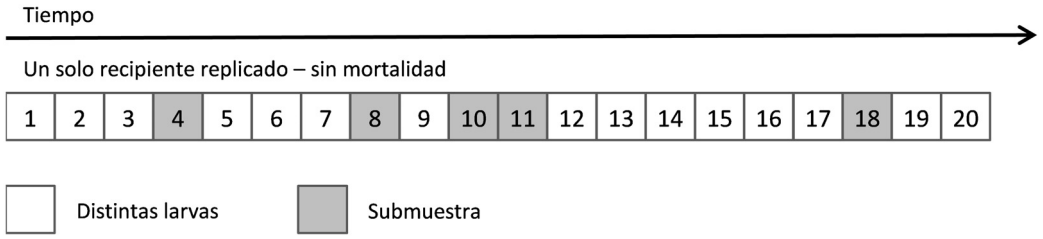
41. El objetivo es tomar muestras de un total de cinco renacuajos en la fase NF 62 por recipiente replicado. Esto debería llevarse a cabo de forma totalmente aleatoria pero decidida *a priori*. En la **figura 1** se presenta un ejemplo hipotético de un recipiente replicado. Si en un recipiente concreto hay 20 renacuajos supervivientes cuando el primer individuo alcanza la fase NF 62, deben elegirse cinco números aleatorios entre el 1 y el 20. El renacuajo n.º 1 es el primer individuo que llega a la fase NF 62 y el renacuajo n.º 20 es el último individuo de un recipiente que llega a la fase NF 62. Análogamente, si hay 18 larvas supervivientes en un recipiente, deben elegirse cinco números aleatorios entre el 1 y el 18. Esto debe hacerse con cada recipiente replicado cuando el primer individuo del ensayo llega a la fase NF 62. Si se producen muertes durante el muestreo de la fase NF 62, las muestras restantes deben volver a aleatorizarse sobre la base de cuántas larvas quedan por debajo de la fase NF 62 y de cuántas muestras más son necesarias para alcanzar un total de cinco muestras de esa réplica. El día en que un renacuajo llega a la fase NF 62, se acude al diagrama de muestreo preparado para

▼**M8**

determinar si ese individuo es objeto de muestreo o se separa físicamente de los renacuajos restantes para seguir con la exposición. En el ejemplo proporcionado (figura 1), el primer individuo que llega a la fase NF 62 (es decir, casilla n.º 1) se separa físicamente de las otras larvas, continúa la exposición y se registra el día del estudio en que ese individuo ha llegado a la fase NF 62. Posteriormente, los individuos n.º 2 y n.º 3 se tratan del mismo modo que el n.º 1 y, a continuación, se muestrea el individuo n.º 4 en cuanto al crecimiento y la histología de la tiroides (con arreglo a este ejemplo). Este procedimiento continúa hasta que el individuo n.º 20 se incorpora al resto de los individuos de fase NF posterior a la 62 o es objeto de muestreo. El procedimiento aleatorio utilizado debe garantizar la misma probabilidad de selección a cada organismo del ensayo. Esto puede conseguirse utilizando cualquier método de aleatorización, pero también exige que cada renacuajo se recoja con red en algún momento a lo largo del período de submuestreo de la fase NF 62.

*Figura 1*

**Ejemplo hipotético de régimen de muestreo de la fase NF 62 con un solo recipiente replicado**




42. En el submuestreo de larvas, los parámetros obtenidos son: 1) tiempo hasta la fase NF 62 (es decir, número de días entre la fertilización y la fase NF 62), 2) anomalías externas, 3) morfometría (p. ej., peso y longitud) y 4) histología de la tiroides.

*Sacrificio compasivo de los renacuajos*

43. La submuestra de los renacuajos de la fase NF 62 (5 individuos por réplica) debe sacrificarse de forma compasiva mediante inmersión durante 30 minutos en cantidades adecuadas (p. ej., 500 ml) de solución anestésica (por ejemplo, solución al 0,3 % de MS-222, metanosulfonato de tricaína, n.º CAS 886-86-2). La solución de MS-222 debe amortiguarse con bicarbonato sódico a un pH de aproximadamente 7,0, ya que la solución de MS-222 sin amortiguar es ácida e irritante para la piel de las ranas, lo que da lugar a una absorción deficiente y a un estrés adicional innecesario para los animales.

44. Utilizando una red con cerco, se retira un renacuajo de la cámara experimental y se lleva a la solución de sacrificio compasivo. Se sacrifica adecuadamente al animal, que está listo para la autopsia cuando no responde a estímulos externos, como el pellizcar la extremidad posterior con un par de pinzas.

*Morfometría (peso y longitud)*

45. Las mediciones del peso húmedo (con precisión de 1 mg) y de la longitud del hocico a la cloaca (SVL, *snout-to-vent length*) (con precisión de 0,1 mm) de cada renacuajo debe realizarse inmediatamente después de que el animal deje de responder por efecto de la anestesia (figura 2a). Para medir la SVL a

▼M8

partir de una fotografía se podrá utilizar un programa informático de análisis de imágenes. Los renacuajos se secan con material absorbente antes de pesarse, para eliminar el exceso de agua adherida. Después de efectuar las mediciones del tamaño (peso y SVL) se deben registrar o anotar las eventuales anomalías morfológicas macroscópicas y/o signos clínicos de toxicidad como escoliosis (véase el apéndice 8), petequias y hemorragia, y se recomienda la documentación digital. Téngase en cuenta que las petequias son pequeñas hemorragias rojas o púrpura en los capilares de la piel.

*Recogida y fijación de tejidos*

46. En la submuestra de las larvas, se realiza una evaluación de la histología de la glándula tiroidea. Se retira y desecha el tronco inferior posterior a las extremidades anteriores. La canal cortada se fija en fijador de Davidson. El volumen de fijador del recipiente debe ser, como mínimo, diez veces el volumen aproximado de los tejidos. Para fijar adecuadamente los tejidos de interés debe aplicarse una agitación o una circulación adecuadas de la solución fijadora. Todos los tejidos permanecen en fijador de Davidson durante al menos 48 horas, pero no más de 96 horas, tras lo cual se lavan en agua desionizada y se conservan en formol al 10 % amortiguado a pH neutro (1) (29).

*Histología de la glándula tiroidea*

47. Las glándulas tiroideas de cada submuestra de larvas (con los tejidos fijados) se evalúan histológicamente, es decir, se efectúa un diagnóstico y una clasificación de la gravedad (29) (30).

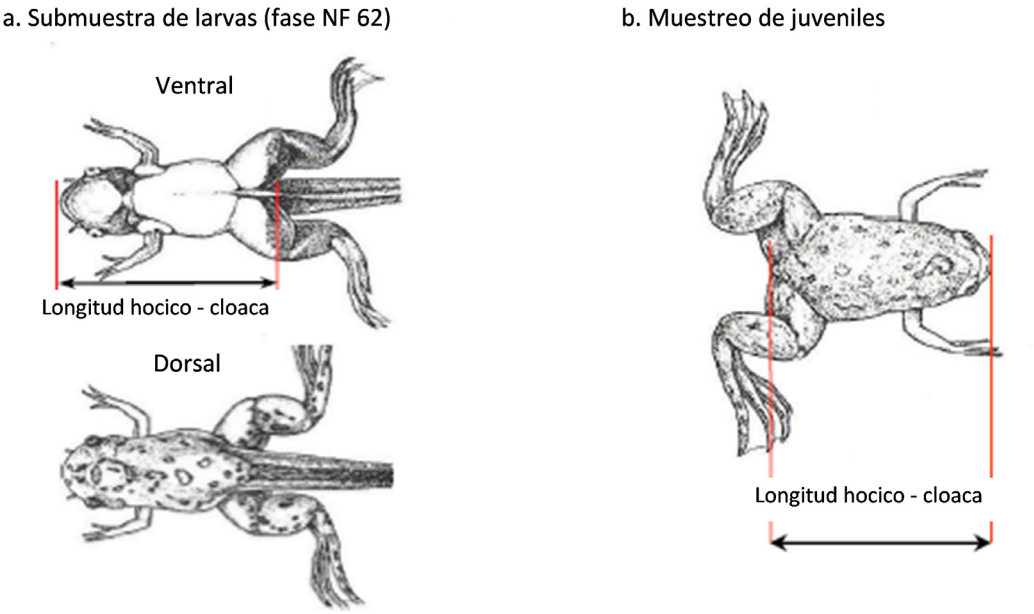



**Figura 2** Puntos de referencia para medir la longitud del hocico a la cloaca correspondiente al LAGDA en la fase NF 62 (a) y en ranas juveniles (b). Características definitorias de la fase NF 62 (a): la cabeza tiene la misma anchura que el tronco, la longitud del nervio olfativo es menor que el diámetro del bulbo olfativo (vista dorsal), y las extremidades anteriores se encuentran al nivel del corazón (vista ventral). Imágenes adaptadas de Nieuwkoop y Faber (1994).

**Final de la exposición de las larvas**

48. Dado el número inicial de renacuajos, se prevé que probablemente habrá un pequeño porcentaje de individuos que no se desarrollen normalmente y no completen la metamorfosis (fase NF 66) en un plazo razonable. La porción

▼M8

de la exposición en fase larvaria no debe ser superior a 70 días. Los renacuajos que permanezcan al final de este período deben sacrificarse de forma compasiva (véase el punto 43), su peso húmedo y SVL deben medirse, se les debe asignar una fase según Nieuwkoop y Faber, 1994, y deben anotarse las eventuales anomalías del desarrollo.

**Sacrificio parcial tras la fase NF 66**

49. Deben mantenerse diez individuos por recipiente después de la fase NF 66 (reabsorción completa de la cola) hasta la terminación de la exposición. Por tanto, después de que todos los animales hayan alcanzado la fase NF 66 o bien después de 70 días (lo que ocurra primero), debe procederse a un sacrificio parcial. Deben seleccionarse aleatoriamente los animales tras la fase NF 66 que no continúen con la exposición.

50. Se sacrifican de forma compasiva los animales que no se seleccionen para seguir con la exposición (véase el punto 43). Se realizan con cada animal mediciones de la fase de desarrollo, peso húmedo y SVL (figura 2b) y una autopsia macroscópica. Se anota el sexo fenotípico (sobre la base de la morfología de las gónadas) como hembra, macho o indeterminado.

**Muestreo de juveniles**

*Esquema del muestreo de juveniles*

51. El resto de los animales sigue con la exposición hasta 10 semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 en el testigo del agua de dilución (y/o en el control del disolvente, si procede). Al final del período de exposición, se sacrifican de forma compasiva los animales restantes (hasta un máximo de 10 ranas por réplica), y se miden o evalúan los diversos parámetros, y se registran: 1) la morfometría (peso y longitud), 2) la proporción de sexos fenotípicos/genotípicos, 3) el peso del hígado (índice hepatosomático), 4) la histopatología (gónadas, conductos genitales, riñón e hígado) y, de formal opcional, 5) la VTG plasmática.

*Sacrificio compasivo de las ranas*

52. Las muestras de juveniles, ranas postmetamórficas, se sacrifican de forma compasiva mediante inyección intraperitoneal de anestésico, por ejemplo MS-222 al 10 % en una solución amortiguadora de fosfato adecuada. Pueden tomarse muestras de las ranas después de que dejen de reaccionar (generalmente en torno a 2 minutos después de la inyección, si se utiliza MS-222 al 10 % a la dosis de 0,01 ml/g de rana). Si bien las ranas juveniles pueden sumergirse en solución de anestésico (MS-222) de mayor concentración, la experiencia ha demostrado que se tarda más tiempo en lograr la anestesia mediante este método y la duración puede no ser adecuada para permitir el muestreo. La inyección proporciona una eutanasia rápida y eficiente antes de la toma de muestras. No debe iniciarse el muestreo hasta que se haya confirmado la ausencia de respuesta de las ranas para garantizar que los animales están muertos. Si las ranas muestran signos de sufrimiento considerable (que sea muy intenso, y que pueda predecirse de manera fiable la muerte) y se consideran moribundas, los animales deben anestesiarse y sacrificarse de forma compasiva, y estos casos deben tratarse como mortalidad a efectos del análisis de los datos. Cuando se sacrifica una rana debido a la morbilidad, este extremo debe tenerse en cuenta y registrarse. En función del momento en que se sacrifique la rana durante el estudio, se puede conservar la rana para llevar a cabo un análisis histopatológico (fijando la rana con vistas al posible estudio de su histopatología).

*Morfometría (peso y longitud)*

53. Las mediciones del peso húmedo y de la SVL (figura 2b) son idénticas a las señaladas en el submuestreo de larvas.

▼M8

*VTG plasmática (opción)*

54. La VTG es un biomarcador ampliamente aceptado derivado de la exposición a sustancias estrogénicas. Para el LAGDA, la VTG plasmática puede medirse opcionalmente en muestras de juveniles (esto puede ser especialmente pertinente si se sospecha que el producto problema es un estrógeno).

55. Se cortan las extremidades posteriores de juveniles sacrificados de forma compasiva y se recoge sangre con un capilar heparinizado (aunque pueden ser adecuados otros métodos de recogida de sangre, como la punción cardíaca). La sangre se pasa a un tubo de microcentrifugación (p. ej., de 1,5 ml de volumen) y se centrifuga para obtener plasma. Las muestras de plasma deben almacenarse a la temperatura máxima de -70 °C hasta la determinación de la VTG. La concentración de la VTG plasmática puede medirse mediante un método de enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) (apéndice 6), o mediante un método alternativo como la espectrometría de masas (31). Se prefieren los anticuerpos específicos de la especie debido a su mayor sensibilidad.

*Determinación del sexo genético*

56. El sexo genético de cada rana juvenil se evalúa sobre la base de los marcadores desarrollados por Yoshimoto *et al.* (11). Para determinar el sexo genético, una porción (o la totalidad) de una extremidad posterior (o de cualquier otro tejido) que se haya retirado durante la disección se recoge y conserva en un tubo de microcentrifugación (las muestras de tejido de las ranas pueden obtenerse a partir de cualquier tejido). Los tejidos pueden conservarse a la temperatura máxima de -20 °C hasta el aislamiento del ácido desoxirribonucleico (ADN). El aislamiento del ADN de los tejidos puede efectuarse con juegos disponibles en el mercado, y el análisis para detectar la presencia o ausencia del marcador se realiza mediante un método de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) (apéndice 5). Generalmente, la concordancia entre el sexo histológico y el genotipo en todos los animales testigo en el momento del muestreo de juveniles en los grupos testigos es superior al 95 %.

*Recogida de tejidos y fijación para el estudio de la histopatología*

57. Se recogen las gónadas, los conductos genitales, los riñones y los hígados para llevar a cabo un análisis histológico durante el muestreo final. Se abre la cavidad abdominal y se extrae y pesa el hígado. A continuación, los órganos digestivos (p. ej., estómago, intestinos) se retiran cuidadosamente de la parte inferior del abdomen para dejar a la vista las gónadas, los riñones y los conductos genitales. Deben registrarse las eventuales anomalías morfológicas macroscópicas de las gónadas. Por último, deben retirarse las extremidades posteriores si no se habían retirado previamente para la extracción de sangre. Los hígados recogidos y las canales con las gónadas dejadas *in situ* deben ponerse inmediatamente en fijador de Davidson. El volumen de fijador del recipiente debe ser, como mínimo, diez veces el volumen aproximado de los tejidos. Todos los tejidos permanecen en fijador de Davidson durante al menos 48 horas, pero no más de 96 horas, tras lo cual se lavan en agua desionizada y se conservan en formol al 10 % amortiguado a pH neutro (1) (29).

*Histopatología*

58. Cada muestra de juveniles se evalúa en cuanto a la histopatología de las gónadas, los conductos genitales, los riñones y el tejido hepático, es decir, se efectúa un diagnóstico y una clasificación de la gravedad (32). El fenotipo de las gónadas se obtiene también de esta evaluación (p. ej., ovarios, testículos, hermafroditismo) y, junto con las valoraciones individuales del sexo genético, estas observaciones se pueden utilizar para calcular la proporción de sexos fenotípicos/genotípicos.

▼M8

DATOS E INFORME

**Análisis estadístico**

59. El LAGDA genera tres tipos de datos que se han de analizar estadísticamente: 1) datos cuantitativos continuos (peso, SVL, IHS, VTG), 2) datos de tiempo hasta un evento en cuanto a las tasas de desarrollo (es decir, días hasta la fase NF 62 desde la iniciación del ensayo) y 3) datos ordinales en forma de puntuaciones de gravedad o fases de desarrollo a partir de las evaluaciones de histopatología.

60. Se recomienda que el diseño del ensayo y la selección de la prueba estadística aporten una potencia adecuada para detectar los cambios de importancia biológica en los parámetros respecto a los que debe comunicarse una NOEC o una CEx. Es preferible que los análisis estadísticos de los datos (en general, sobre la base de la media de las réplicas) sigan los procedimientos descritos en el Documento sobre enfoques actuales del análisis de datos de ecotoxicidad, orientaciones sobre la aplicación (33). En el apéndice 7 del presente método de ensayo figura el árbol de decisiones de análisis estadísticos recomendado y la orientación para el tratamiento de los datos y la elección del ensayo o modelo estadístico más adecuado para su uso en el LAGDA.

61. Los datos del muestreo de juveniles (p. ej., crecimiento, IHS) deben analizarse respecto a cada sexo genotípico por separado, ya que el sexo genotípico se determina en todas las ranas.

**Consideraciones relativas al análisis de los datos**

*Uso de réplicas y tratamientos alterados*

62. Las réplicas y los tratamientos pueden verse alterados debido al exceso de mortalidad por toxicidad manifiesta, enfermedad o error técnico. Si un tratamiento está alterado debido a una enfermedad o a un error técnico, debe haber tres tratamientos no alterados con tres réplicas no alteradas disponibles para el análisis. Si se produce toxicidad manifiesta en el tratamiento o tratamientos elevados, es preferible que haya al menos tres niveles de tratamiento con tres réplicas no alteradas disponibles para su análisis [en consonancia con el enfoque de concentración máxima tolerada para las directrices de ensayo de la OCDE (34)]. Además de la mortalidad, entre los signos de toxicidad manifiesta se pueden incluir efectos sobre el comportamiento (por ejemplo, flotar en la superficie, quedarse en el fondo del recipiente, nadar de forma inversa o irregular, no subir a la superficie), lesiones morfológicas (por ejemplo, lesiones hemorrágicas, edema abdominal) o inhibición de respuestas de alimentación normales en comparación cualitativa con los animales testigo.

*Control del disolvente*

63. Al finalizar el ensayo, debe efectuarse una evaluación de los efectos potenciales del disolvente (si se utiliza). Esto se realiza mediante una comparación estadística del grupo de control del disolvente y del grupo testigo del agua de dilución. Los parámetros más pertinentes que deben tenerse en cuenta en este análisis son los factores determinantes del crecimiento (peso y longitud), ya que pueden verse afectados por una toxicidad generalizada. Si se detectan diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros entre el grupo testigo del agua de dilución y el grupo control del disolvente, debe aplicarse el mejor juicio profesional para determinar si está afectada la validez del ensayo. Si los dos grupos difieren, deben compararse con el control del disolvente los tratamientos expuestos al producto, a menos que se sepa que es preferible la comparación con el testigo del agua de dilución. Si no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, se recomienda comparar los tratamientos expuestos al producto problema con los grupos testigo reunidos (grupo de control del disolvente y grupo testigo del agua de dilución), a menos que se sepa que es preferible la comparación solo con el grupo testigo del agua de dilución o con el grupo de control del disolvente.

▼M8

**Informe del ensayo**

64. El informe del ensayo debe incluir lo siguiente:

*Producto problema:*

— Naturaleza física y, en su caso, propiedades fisicoquímicas;

— Sustancias de un solo componente:

aspecto físico, hidrosolubilidad y otras propiedades fisicoquímicas pertinentes;

identificación química, como nombres IUPAC o CAS, número CAS, código SMILES o InChI, fórmula estructural, pureza, identidad química de las impurezas si procede y es viable en la práctica (incluido el contenido de carbono orgánico, si procede).

— Sustancias de componentes múltiples, UVCB y mezclas:

caracterizadas en la medida de lo posible por la identidad química (véase el párrafo anterior), la cantidad en que están presentes y las propiedades fisicoquímicas pertinentes de sus componentes.

*Especie de ensayo:*

— Nombre científico, cepa si se conoce, fuente y método de recogida de los huevos fertilizados y manipulaciones posteriores.

— Incidencia de la escolosis en los testigos históricos del cultivo madre utilizado.

*Condiciones del ensayo:*

— Fotoperíodo o fotoperíodos;

— Diseño del ensayo (por ejemplo, tamaño, material y volumen de agua de la cámara, número de cámaras de ensayo y de réplicas, número de organismos de ensayo por réplica);

— Método de preparación de las soluciones madre y frecuencia de renovación (en su caso, se especificará el agente solubilizante empleado y su concentración);

— Método de administración del producto problema (p. ej., bombas, sistemas de dilución);

— Eficiencia de recuperación del método y concentraciones nominales de ensayo, límite de detección, medias de los valores medidos en los recipientes de ensayo y sus desviaciones típicas, método de obtención y datos que muestren que las mediciones se refieren a las concentraciones del producto problema en disolución verdadera;

— Características del agua de dilución: pH, dureza, temperatura, concentración de oxígeno disuelto, contenido de cloro residual (si se ha medido), yodo total, carbono orgánico total, sólidos en suspensión (si se ha medido), salinidad del medio de ensayo (si se ha medido) y cualquier otra medición realizada;

— Concentraciones nominales de ensayo, medias de los valores medidos y sus desviaciones típicas;

— Calidad del agua en los recipientes de ensayo, pH, temperatura (diaria) y concentración de oxígeno disuelto;

▼**M8**

— Información detallada de la alimentación (por ejemplo, tipo de alimentos, procedencia, cantidad proporcionada y frecuencia).

*Resultados:*

— Prueba de que los testigos satisfacen los criterios de validez:

— Datos del testigo (más control del disolvente cuando se utilice) y de los lotes de tratamiento como sigue: mortalidad y anomalías observadas, tiempo hasta la fase NF 62, evaluación histológica de la glándula tiroidea (solo en la muestra de larvas), crecimiento (peso y longitud), IHS (solo en la muestra de juveniles), proporción de sexos genéticos/fenotípicos (solo en la muestra de juveniles), resultados de la evaluación de la histopatología de las gónadas, los conductos genitales, los riñones y los hígados (solo en la muestra de juveniles) y la VTG plasmática (solo en la muestra de juveniles, si se ha realizado);

— Enfoque del análisis estadístico y del tratamiento de los datos (prueba o modelo estadístico utilizado);

— Concentración sin efecto observado (NOEC) para cada respuesta evaluada;

— Concentración mínima con efecto observado (LOEC) para cada respuesta evaluada (con $\alpha = 0{,}05$); si procede, CEx para cada respuesta evaluada e intervalos de confianza (p. ej., del 95 %), así como una representación gráfica del modelo ajustado usado para su cálculo, la pendiente de la curva de concentración-respuesta, la fórmula del modelo de regresión, los parámetros estimados del modelo y sus errores típicos;

— Eventuales desviaciones del método de ensayo y de los criterios de aceptación, así como consideración de sus posibles consecuencias sobre el resultado del ensayo.

65. En cuanto a los resultados de las mediciones de los parámetros, deben presentarse los valores medios y sus desviaciones típicas (tanto en relación con las réplicas como en relación con las concentraciones, si es posible).

66. El tiempo mediano hasta la fase NF 62 en los testigos debe calcularse y presentarse como la media de las medianas de las réplicas y su desviación típica. Análogamente, en el caso de los tratamientos, la mediana del tratamiento debe calcularse y presentarse como la media de las medianas de las réplicas y su desviación típica.

**BIBLIOGRAFÍA**

(1) U.S. Environmental Protection Agency (2013). Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report.

(2) OCDE (2012 a). Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Endocrine Disrupters. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 150), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(3) Nieuwkoop PD and Faber J. (1994). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland Publishing, Inc, New York, NY, USA.

(4) Kloas W and Lutz I. (2006). Amphibians as Model to Study Endocrine Disrupters. Journal of Chromatography A 1130: 16-27.

▼**M8**

(5) Chang C, Witschi E. (1956). Genic Control and Hormonal Reversal of Sex Differentiation in *Xenopus*. Journal of the Royal Society of Medicine 93: 140-144.

(6) Gallien L. (1953). Total Inversion of Sex in *Xenopus laevis* Daud, Following Treatment with Estradiol Benzoate Administered During Larval Stage. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences 237: 1565.

(7) Villalpando I and Merchant-Larios H. (1990). Determination of the Sensitive Stages for Gonadal Sex-Reversal in *Xenopus Laevis* Tadpoles. International Journal of Developmental Biology 34: 281-285.

(8) Miyata S, Koike S and Kubo T. (1999). Hormonal Reversal and the Genetic Control of Sex Differentiation in *Xenopus*. Zoological Science 16: 335-340.

(9) Mikamo K and Witschi E. (1963). Functional Sex-Reversal in Genetic Females of *Xenopus laevis*, Induced by Implanted Testes. Genetics 48: 1411.

(10) Olmstead AW, Kosian PA, Korte JJ, Holcombe GW, Woodis K and Degitz SJ. (2009)a. Sex reversal of the Amphibian, *Xenopus tropicalis*, Following Larval Exposure to an Aromatase Inhibitor. Aquatic Toxicology 91: 143-150.

(11) Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T and Ito M. (2008). A W-linked DM-Domain Gene, DM-W, Participates in Primary Ovary Development in *Xenopus Laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

(12) Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S and Degitz SJ. (2009)b. Reproductive Maturation of the Tropical Clawed Frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

(13) Tobias ML, Tomasson J and Kelley DB. (1998). Attaining and Maintaining Strong Vocal Synapses in Female *Xenopus laevis*. Journal of Neurobiology 37: 441-448.

(14) Qin ZF, Qin XF, Yang L, Li HT, Zhao XR and Xu XB. (2007). Feminizing/Demasculinizing Effects of Polychlorinated Biphenyls on the Secondary Sexual Development of *Xenopus Laevis*. Aquatic Toxicology 84: 321-327.

(15) Porter KL, Olmstead AW, Kumsher DM, Dennis WE, Sprando RL, Holcombe GW, Korte JJ, Lindberg-Livingston A and Degitz SJ. (2011). Effects of 4-*Tert*-Octylphenol on *Xenopus Tropicalis* in a Long Term Exposure. Aquatic Toxicology 103: 159-169.

(16) ASTM. (2002). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. ASTM E729-96, Philadelphia, PA, USA.

(17) Capítulo C.4 del presente anexo, Determinación de la biodegradabilidad «fácil».

(18) Capítulo C.29 del presente anexo, Biodegradabilidad fácil - $CO_2$ en recipientes sellados (ensayo del espacio de cabeza).

(19) Kahl MD, Russom CL, DeFoe DL and Hammermeister DE (1999). Saturation Units for Use in Aquatic Bioassays. Chemosphere 39: 539-551.

▼**M8**

(20) Adolfsson-Erici M, Åkerman G, Jahnke A, Mayer P, McLachlan MS (2012). A flow-through passive dosing system for continuously supplying aqueous solutions of hydrophobic chemicals to bioconcentration and aquatic toxicity tests. Chemosphere, 86(6): 593-9.

(21) OCDE (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 23), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(22) Hutchinson TH, Shillabeer N, Winter MJ and Pickford DB. (2006). Acute and Chronic Effects of Carrier Solvents in Aquatic Organisms: A Critical Review. Review. Aquatic Toxicology 76: 69-92.

(23) ASTM (2004). Standard Guide for Conducting the Frog Embryo Teratogenesis Assay - *Xenopus* (FETAX). ASTM E1439 - 98, Philadelphia, PA, USA.

(24) Read BT (2005). Guidance on the Housing and Care of the African Clawed Frog *Xenopus Laevis*. Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals (RSPCA), Horsham, Sussex, U.K., 84 pp.

(25) Capítulo C.38 del presente anexo, Ensayo sobre metamorfosis de anfibios.

(26) Capítulo C.48 del presente anexo, Ensayo de reproducción de peces a corto plazo.

(27) Capítulo C.41 del presente anexo, Ensayo de desarrollo sexual en peces.

(28) Capítulo C.49 del presente anexo, Ensayo de toxicidad aguda en embriones de pez (FET).

(29) OCDE (2007). Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology.Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment. (No. 82) Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(30) Grim KC, Wolfe M, Braunbeck T, Iguchi T, Ohta Y, Tooi O, Touart L, Wolf DC and Tietge J. (2009). Thyroid Histopathology Assessments for the Amphibian Metamorphosis Assay to Detect Thyroid-Active Substances, Toxicological Pathology 37: 415-424.

(31) Luna LG and Coady K.(2014). Identification of *X. laevis* Vitellogenin Peptide Biomarkers for Quantification by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Analytical and Bioanalytical Techniques 5(3): 194.

(32) OCDE (2015). Guidance on histopathology techniques and evaluation. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 228), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(33) OCDE (2006). Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application. Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment, (No. 54), Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, París.

(34) Hutchinson TH, Bögi C, Winter MJ, Owens JW, 2009. Benefits of the Maximum Tolerated Dose (MTD) and Maximum Tolerated concentration (MTC) Concept in Aquatic Toxicology. Aquatic Toxicology 91(3): 197-202.

▼**M8**

*Apéndice 1*

DEFINICIONES

**Parámetro principal**: Parámetro que causa un efecto a nivel de la población.

**Producto**: Sustancia o mezcla.

**ELISA**: Enzimoinmunoanálisis de adsorción.

**CEx**: Concentración con efecto del x %; es la concentración que provoca el x % de un efecto sobre los organismos de ensayo dentro de un determinado período de exposición cuando se compara con un testigo. Por ejemplo, una CE50 es una concentración de la que se estima que causa un efecto sobre un parámetro de ensayo en el 50 % de una población expuesta a lo largo de un determinado período de exposición.

**dtf**: Días tras la fertilización.

**Ensayo dinámico**: Ensayo con un flujo continuo de soluciones de ensayo por el sistema de ensayo durante la duración de la exposición.

**Eje HPG**: Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (*hypothalamic-pituitary-gonadal*).

**IUPAC**: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

**Concentración mínima con efecto observado (LOEC)**: Concentración más baja de producto problema con la que se observa un efecto estadístico significativo (con $p < 0,05$) en comparación con el testigo. Además, todas las concentraciones de ensayo superiores a la LOEC deben ejercer un efecto nocivo igual o mayor que el observado a dicha concentración. Si no se cumplen estas dos condiciones, es preciso dar una explicación completa sobre cómo se ha elegido la LOEC (y, por tanto, la NOEC). En el apéndice 7 se recogen las orientaciones pertinentes.

**Concentración letal mediana (CL50)**: Concentración de un producto problema de la que se estima que mata al 50 % de los organismos de ensayo durante la duración del ensayo.

**Concentración sin efecto observado (NOEC)**: Concentración de ensayo inmediatamente inferior a la LOEC que, en comparación con el testigo, no ejerce ningún efecto estadísticamente significativo ($p < 0,05$) dentro del período de exposición establecido.

**SMILES**: Sistema Simplificado de Registro de Líneas Moleculares (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*).

**Producto problema**: Toda sustancia o mezcla sometida a ensayo con este método de ensayo.

**UVCB**: Sustancias de composición desconocida o variable, productos complejos de reacción o materiales biológicos.

**VTG**: La vitelogenina es una fosfolipoglucoproteína precursora de la proteína de la yema de huevo que normalmente se produce en las hembras sexualmente activas de todas las especies ovíparas.

▼**M8**

*Apéndice 2*

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DEL AGUA DE DILUCIÓN ADECUADA

| Sustancia | Límite de concentración |
|---|---|
| Partículas | 5 mg/l |
| Carbono orgánico total | 2 mg/l |
| Amoníaco no ionizado | 1 µg/l |
| Cloro residual | 10 µg/l |
| Plaguicidas organofosforados totales | 50 ng/l |
| Plaguicidas organoclorados totales y bifenilos policlorados | 50 ng/l |
| Cloro orgánico total | 25 ng/l |
| Aluminio | 1 µg/l |
| Arsénico | 1 µg/l |
| Cromo | 1 µg/l |
| Cobalto | 1 µg/l |
| Cobre | 1 µg/l |
| Hierro | 1 µg/l |
| Plomo | 1 µg/l |
| Níquel | 1 µg/l |
| Cinc | 1 µg/l |
| Cadmio | 100 ng/l |
| Mercurio | 100 ng/l |
| Plata | 100 ng/l |

▼**M8**

*Apéndice 3*

CONDICIONES DE ENSAYO DEL LAGDA

| | |
|---|---|
| 1. Especie de ensayo | *Xenopus laevis* |
| 2. Tipo de ensayo | Dinámico continuo |
| 3. Temperatura del agua | La temperatura nominal es de 21°C. La temperatura media a lo largo de la duración del ensayo es de 21 ± 1°C (las diferencias entre réplicas y entre tratamientos no deben superar el valor de 1,0 °C). |
| 4. Calidad de la iluminación | Bombillas fluorescentes (de amplio espectro) 600-2 000 lux (lúmenes por $m^2$) en la superficie del agua |
| 5. Fotoperíodo | 12 h de luz, 12 h de oscuridad |
| 6. Volumen de la solución de ensayo y recipiente de ensayo | 4-10 l (profundidad mínima del agua: 10-15 cm)<br>Recipiente de vidrio o de acero inoxidable |
| 7. Intercambios de volumen de las soluciones de ensayo | Constante, teniendo en cuenta tanto el mantenimiento de las condiciones biológicas como la exposición al producto (por ejemplo, cinco renovaciones del volumen del recipiente al día). |
| 8. Edad de los organismos de ensayo en el momento del inicio | Fase de Nieuwkoop y Faber (NF) 8-10 |
| 9. Número de organismos por réplica | 20 animales (embriones) / recipiente (réplica) al inicio de exposición y 10 animales (juveniles) / recipiente (réplica) después de la fase NF 66 hasta la terminación de la exposición. |
| 10. Número de tratamientos | Como mínimo, cuatro tratamientos con el producto problema más el testigo o testigos adecuados |
| 11. Número de réplicas por tratamiento | Cuatro réplicas por tratamiento con el producto problema y ocho réplicas con el testigo o testigos |
| 12. Número de organismos por concentración del ensayo | Como mínimo ochenta animales por tratamiento con el producto problema y ciento sesenta animales con el testigo o testigos |
| 13. Agua de dilución | Cualquier agua que permita el crecimiento y el desarrollo normales de *X. laevis* (por ejemplo, agua de manantial o agua del grifo pasada por filtro de carbón) |
| 14. Aireación | No es obligatoria, pero puede ser necesario airear los depósitos si los niveles de oxígeno disuelto caen por debajo de los límites recomendados y aumenta al máximo el flujo de solución de ensayo. |
| 15. Oxígeno disuelto de la solución de ensayo | Oxígeno disuelto: ≥ 40 % del valor de saturación del aire o ≥ 3,5 mg/l |

▼**M8**

| | | |
|---|---|---|
| 16. | pH de las soluciones de ensayo | 6,5-8,5 (las diferencias entre réplicas y entre tratamientos no deben superar el valor de 0,5) |
| 17. | Dureza y alcalinidad de la solución de ensayo | 10-250 mg $CaCO_3$/l |
| 18. | Régimen de alimentación | (Véase el apéndice 4) |
| 19. | Período de exposición | Desde la fase NF 8-10 hasta diez semanas después del tiempo mediano hasta la fase NF 62 en el grupo testigo del agua y/o del disolvente (máximo de 17 semanas) |
| 20. | Parámetros biológicos | Mortalidad (y anomalías observadas), tiempo hasta la fase NF 62 (muestra de larvas), evaluación histológica de la glándula tiroidea (muestra de larvas), crecimiento (peso y longitud), índice hepatosomático (muestra de juveniles), proporción de sexos genéticos/fenotípicos (muestra de juveniles), histopatología de las gónadas, los conductos genitales, los riñones y los hígados (muestra de juveniles) y la vitelogenina plasmática (muestra de juveniles, opcional) |
| 21. | Criterios de validez del ensayo | El oxígeno disuelto debe ser > 40 % del valor de saturación del aire; la temperatura media del agua debe ser de 21 ± 1°C, y las diferencias entre réplicas y entre tratamientos deben ser < 1,0°C; el pH de la solución de ensayo debe oscilar entre 6,5 y 8,5; la mortalidad en el testigo debe ser ≤ 20 % en cada réplica, y el tiempo medio hasta la fase NF 62 en el testigo debe ser ≤ 45 días; el peso medio de los organismos de ensayo en la fase NF 62 y a la terminación del ensayo en los testigos y, en su caso, en los controles del disolvente debe alcanzar el valor de 1,0 ± 0,2 y 11,5 ± 3 g, respectivamente; debe haber pruebas disponibles para demostrar que las concentraciones del producto problema en la solución se han mantenido debidamente dentro de un intervalo de ± 20 % de la media de los valores medidos. |

▼M8

*Apéndice 4*

RÉGIMEN DE ALIMENTACIÓN

Hay que señalar que, aunque se recomienda este régimen de alimentación, pueden aceptarse otras alternativas siempre que permitan que los organismos de ensayo crezcan y se desarrollen a un ritmo adecuado.

***Alimentación de las larvas***

*Preparación de la dieta para larvas*

A. Combinación 1: 1 (v/v) de mezcla de alimento inicial para truchas con mezcla de algas/TetraFin® (o equivalente);

1. Mezcla de alimento inicial para truchas: mezclar 50 g de alimento inicial para truchas (gránulos finos o polvo) y 300 ml de agua filtrada apropiada en una batidora durante 20 segundos

2. Mezcla de algas/TetraFin® (o equivalente): mezclar 12 g de discos del alga *Spirulina* y 500 ml de agua filtrada en una batidora durante 40 segundos; mezclar 12 g de TetraFin® (o equivalente) con 500 ml de agua filtrada y, a continuación, combinar estas mezclas para obtener un litro de suspensión de 12 g/l de algas *Spirulina* y 12 g/l de TetraFin® (o equivalente)

3. Combinar volúmenes iguales de la mezcla de alimento inicial para truchas y de la mezcla de algas/TetraFin® (o equivalente).

B. Artemia salina:

Se hacen eclosionar 15 ml de huevos de artemia salina en 1 l de agua salada (preparada añadiendo 20 ml de NaCl a 1 l de agua desionizada). Tras airear durante 24 horas a temperatura ambiente con iluminación constante, se recolectan las artemias salinas. Brevemente, durante 30 minutos se interrumpe la aireación para permitir que se depositen las artemias salinas. Los quistes que flotan en la parte superior del recipiente se vierten y se desechan, y las artemias se vierten a través de los filtros adecuados y se llevan a 30 ml con agua filtrada.

*Protocolo de alimentación*

En el cuadro 1 se indica el tipo y la cantidad de alimentos utilizados en las fases de exposición de las larvas. Los animales deben recibir alimentos tres veces al día de lunes a viernes y una vez al día en los fines de semana.

*Cuadro 1*

**Régimen de alimentación para larvas de *X. laevis* en condiciones dinámicas**

| Tiempo (*) (tras la fertilización) | Alimento inicial para truchas: algas/TetraFin® (o equivalente) | | Artemia salina | |
|---|---|---|---|---|
| | Día entre semana (tres veces al día) | Fin de semana (una vez al día) | Día entre semana (dos veces al día) | Fin de semana (una vez al día) |
| Días 4-14 (en las semanas 0-1) | 0,33 ml | 1,2 ml | 0,5 ml (del día 8 al 15) 1 ml (a partir del día 16) | 0,5 ml (del día 8 al 15) 1 ml (a partir del día 16) |
| Semana 2 | 0,67 ml | 2,4 ml | | |
| Semana 3 | 1,3 ml | 4,0 ml | 1 ml | 1 ml |
| Semana 4 | 1,5 ml | 4,0 ml | 1 ml | 1 ml |
| Semana 5 | 1,6 ml | 4,4 ml | 1 ml | 1 ml |

▼M8

| Tiempo (*) (tras la fertilización) | Alimento inicial para truchas: algas/TetraFin® (o equivalente) | | Artemia salina | |
|---|---|---|---|---|
| | Día entre semana (tres veces al día) | Fin de semana (una vez al día) | Día entre semana (dos veces al día) | Fin de semana (una vez al día) |
| Semana 6 | 1,6 ml | 4,6 ml | 1 ml | 1 ml |
| Semana 7 | 1,7 ml | 4,6 ml | 1 ml | 1 ml |
| Semanas 8-10 | 1,7 ml | 4,6 ml | 1 ml | 1 ml |

(*) El día 0 se define como el día en que se efectúa la inyección de hCG.

**Transición de la dieta para larvas a la dieta para juveniles**

A medida que las larvas completan su metamorfosis, se les aplica la transición a una formulación de la dieta para juveniles que se explica a continuación. Mientras esta transición se está llevando a cabo, la dieta para larvas debe ir reduciéndose a medida que aumenta la alimentación de juveniles. Esto puede lograrse mediante una reducción proporcional de la alimentación de larvas, al tiempo que se incrementa proporcionalmente la alimentación de juveniles, cuando cada grupo de cinco renacuajos sobrepasa la fase NF 62 y se acerca a la terminación de la metamorfosis en la fase NF 66.

**Alimentación de juveniles**

*Dieta para juveniles*

Una vez que se haya completado la metamorfosis (fase 66), el régimen de alimentación se limita a alimento especial para ranas que sedimente, de primera calidad, de 3/32 pulgadas (Xenopus Express™, FL, EE. UU.), o equivalente.

*Preparación de los copos molidos de cara a la transición de larvas a juveniles*

Los copos de alimento para ranas que sedimente se pasan brevemente por un molinillo de café, batidora o mortero, a fin de reducir el tamaño de los copos en aproximadamente 1/3. Si se prolonga el tratamiento, se obtiene polvo, lo que no es recomendable.

*Protocolo de alimentación*

En el **cuadro** 2 se indica el tipo y la cantidad de alimentos utilizados en las fases de juveniles y de adultos. Los animales deben recibir el alimento una vez al día. Cabe señalar que, cuando sufren la metamorfosis, los animales siguen recibiendo una porción de artemias salinas hasta que hayan completado la metamorfosis más del 95 % de los animales.

Los animales no deben recibir alimentos el día de la terminación del ensayo, para que el alimento no altere las mediciones del peso.

*Cuadro 2*

**Régimen de alimentación para juveniles de *X. laevis* en condiciones dinámicas. Cabe señalar que los animales que no han sufrido la metamorfosis, incluidos aquellos cuya metamorfosis se ha retrasado por el tratamiento con el producto, no pueden comer copos sin moler.**

| Tiempo (*) (semanas tras la fecha mediana de metamorfosis) | Copos molidos (mg por rana joven) | Copos enteros (mg por rana joven) |
|---|---|---|
| Al completar los animales su metamorfosis | 25 | 0 |
| Semanas 0-1 | 25 | 28 |

▼**M8**

| Tiempo (*)<br>(semanas tras la fecha mediana de metamorfosis) | Copos molidos<br>(mg por rana joven) | Copos enteros<br>(mg por rana joven) |
|---|---|---|
| Semanas 2-3 | 0 | 110 |
| Semanas 4-5 | 0 | 165 |
| Semanas 6-9 | 0 | 220 |

(*) El primer día de la semana 0 es la fecha mediana de la metamorfosis en los animales testigo.

▼M8

*Apéndice 5*

DETERMINACIÓN DEL SEXO GENÉTICO

El método de determinación del sexo genético de *Xenopus laevis* se basa en Yoshimoto *et al.*, 2008. En esta publicación se pueden consultar, en caso necesario, procedimientos detallados para la determinación del genotipo sexual. Pueden utilizarse métodos alternativos (por ejemplo, la RCP cuantitativa de alto rendimiento) si se consideran adecuados.

**Cebadores de *X. laevis***

*Marcador de DM-W*

*Directo:* 5'-CCACACCCAGCTCATGTAAAG-3'

*Inverso:* 5'-GGGCAGAGTCACATATACTG-3'

*Testigo positivo*

*Directo:* 5'-AACAGGAGCCCAATTCTGAG-3'

*Inverso:* 5'-AACTGCTTGACCTCTAATGC-3'

**Purificación del ADN**

Se purifica el ADN del tejido muscular o cutáneo utilizando, por ejemplo, Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit (n.º de catálogo 69 506) o un producto similar, siguiendo las instrucciones del juego. El ADN puede eluirse a partir de las columnas de centrifugación, utilizando menos amortiguador a fin de obtener muestras más concentradas si se considera necesario para la RCP. Téngase en cuenta que el ADN es bastante estable, por lo que debe velarse por evitar la contaminación cruzada que pudiera dar lugar a una caracterización errónea de los machos como hembras, o viceversa.

**RCP**

En el **cuadro 1** se presenta un ejemplo de protocolo en el que se utiliza la polimerasa JumpStart™ *Taq* de Sigma.

*Cuadro 1*

**Ejemplo de protocolo en el que se utiliza la polimerasa JumpStart™ *Taq* de Sigma.**

| Mezcla de reacción (*master mix*) | 1x (µl) | [Final] |
|---|---|---|
| NFW (*) | 11 | - |
| Amortiguador 10X | 2,0 | - |
| $MgCl_2$ (25 mM) | 2,0 | 2,5 mM |
| dNTP (10 mM cada uno) | 0,4 | 200 µM |
| Marcador de cebador directo (8 µM) | 0,8 | 0,3 µM |
| Marcador de cebador inverso (8 µM) | 0,8 | 0,3 µM |
| Testigo de cebador directo (8 µM) | 0,8 | 0,3 µM |
| Testigo de cebador inverso (8 µM) | 0,8 | 0,3 µM |
| JumpStart™ Taq | 0,4 | 0,05 unidades/µl |
| Molde de ADN | 1,0 | ~ 200 pg/µl |

(*) NFW = Agua libre de nucleasas.
Nota: Al preparar las mezclas de reacción, ha de prepararse más cantidad para compensar las eventuales pérdidas que puedan producirse durante el pipeteado (por ejemplo: debe utilizarse 25x para solo 24 reacciones).

▼**M8**

*Reacción:*

| | |
|---|---|
| Mezcla de reacción (*master mix*) | 19,0 µl |
| Molde | 1,0 µl |
| Total | 20,0 µl |

*Perfil del termociclador:*

| | | |
|---|---|---|
| Etapa 1. | 94°C | 1 min |
| Etapa 2. | 94°C | 30 s |
| Etapa 3. | 60°C | 30 s |
| Etapa 4. | 72°C | 1 min |
| Etapa 5. | Volver a la etapa 2. | 35 ciclos |
| Etapa 6. | 72°C | 1 min |
| Etapa 7. | 4°C | Mantener |

Los productos de la RCP pueden someterse inmediatamente a electroforesis en gel o conservarse a 4°C.

**Electroforesis en gel de agarosa (3 %) (ejemplo de protocolo)**

*50X TAE*

| | |
|---|---|
| Tris | 24,2 g |
| Ácido acético glacial | 5,71 ml |
| $Na_2$ (EDTA)·$2H_2O$ | 3,72 g |

Añadir agua hasta 100 ml

*1X TAE*

| | |
|---|---|
| $H_2O$ | 392 ml |
| 50X TAE | 8 ml |

*Agarosa 3:1*

3 partes de agarosa NuSieve™ GTG™

1 parte de agarosa de Fisher de baja electro-endósmosis (EEO)

*Método*

1. Preparar un gel del 3 % mediante adición de 1,2 g de mezcla de agarosa a 43 ml de 1X TAE. Agitar de forma circular para disociar los grandes grumos.

2. Poner en el horno de microondas la mezcla de agarosa hasta su completa disolución (evitar el desbordamiento por ebullición). Dejar enfriar ligeramente.

3. Añadir 1,0 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml). Agitar de forma circular el matraz. Téngase en cuenta que el bromuro de etidio es mutágeno, por lo que, en la medida en que sea técnicamente posible, deben utilizarse productos alternativos para reducir al mínimo los riesgos para la salud de los trabajadores ([1]).

4. Verter el gel en el molde con peine. Enfriar completamente.

([1]) De acuerdo con el artículo 4, apartado 1, de la Directiva 2004/37/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativa a la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes carcinógenos o mutágenos durante el trabajo (sexta Directiva específica con arreglo al artículo 16, apartado 1, de la Directiva 89/391/CEE del Consejo) (DO L 158 de 30.4.2004, p. 50).

▼**M8**

5. Añadir gel al equipo. Cubrir el gel con 1X TAE.

6. Añadir 1 µl de colorante de carga 6x a cada 10 µl de producto de RCP.

7. Pipetear las muestras a los pocillos.

8. Dejar correr a 160 voltios constantes durante ~20 minutos.

En la **figura 1** se recoge una imagen de gel de agarosa en la que se muestra la distribución de las bandas que corresponden a machos y hembras.

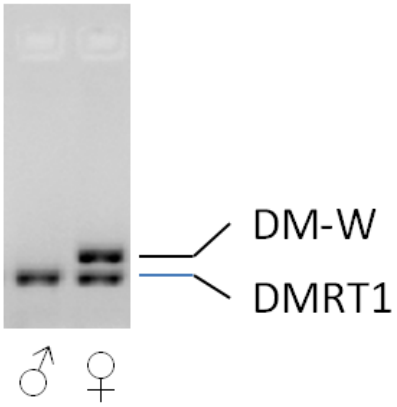



**Figura 1** Imagen del gel de agarosa que muestra la distribución de las bandas de un ejemplar macho (♂) (una sola banda a ~203 pb: DMRT1) y de un ejemplar hembra (♀) (dos bandas a ~259 pb: DM-W y 203 pb: DMRT1).

**BIBLIOGRAFÍA**

Yoshimoto S, Okada E, Umemoto H, Tamura K, Uno Y, Nishida-Umehara C, Matsuda Y, Takamatsu N, Shiba T, Ito M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 2469-2474.

▼M8

*Apéndice 6*

MEDICIÓN DE LA VITELOGENINA

La medición de la vitelogenina (VTG) se realiza mediante un método de enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) que se desarrolló originalmente para la VTG del pez cabeza gorda (Parks *et al.*, 1999). Actualmente no existen anticuerpos disponibles en el comercio para *X. laevis*. Sin embargo, dada la riqueza de la información sobre esta proteína y la disponibilidad de servicios de producción de anticuerpos comerciales rentables, es razonable que los laboratorios puedan desarrollar fácilmente una prueba ELISA para hacer esta medición (Olstead *et al*., 2009). También Olstead *et al*. (2009) aportan una descripción del ensayo modificada para la determinación de la VTG en *X. tropicalis*, tal como se indica a continuación. El método utiliza un anticuerpo preparado contra la VTG de *X. tropicalis*, pero del que se sabe que también funciona con la VTG de *X. laevis*. Cabe señalar que también pueden utilizarse métodos ELISA no competitivos, y que estos pueden tener unos límites de detección inferiores a los del método que se describe a continuación.

**Materiales y reactivos**

— Suero con el primer anticuerpo (Ab) preadsorbido

— Mezclar una parte de suero con el primer Ab contra la VTG de *X. tropicalis* con dos partes de plasma de macho testigo y dejar a temperatura ambiente durante unos 75 minutos, poner en hielo durante 30 minutos, centrifugar > 20K x G durante 1 h a 4°C, eliminar el sobrenadante, tomar una parte alícuota y conservar a -20°C.

— Segundo anticuerpo

— De cabra anti-Ig G de conejo, conjugado con HRP (p. ej., Bio-Rad 172-1019)

— Patrón de VTG

— VTG de *X. laevis* purificada a 3,3 mg/ml

— TMB (3,3',5,5'-tetrametil-bencidina) (p. ej., KPL 50-76-00, o Sigma T0440)

— Suero de cabra normal (NGS, *normal goat serum*) (p. ej., Chemicon® S26-100 ml)

— Placas de microvaloración de poliestireno EIA de 96 pocillos (por ejemplo, ICN: 76-381-04, Costar: 53590, Fisher: 07-200-35)

— Estufa de hibridación (o incubadora de aire de equilibrio rápido) a 37°C, para placas, baño de agua para tubos

— Otros equipos, productos y suministros de laboratorio comunes.

**Composiciones**

*Solución amortiguadora de recubrimiento (solución amortiguadora de carbonato 50 mM, pH 9,6):*

| | |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 1,26 g |
| $Na_2CO_3$ | 0,68 g |
| Agua | 428 ml |

*10X PBS (fosfato 0,1 M, NaCl 1,5 M):*

| | |
|---|---|
| $NaH_2PO_4.H_2O$ | 0,83 g |
| $Na_2HPO_4.7\ H_2O$ | 20,1 g |
| NaCl | 71 g |
| Agua | 810 ml |

▼M8

*Solución amortiguadora de lavado (PBST):*

| | |
|---|---|
| 10X PBS | 100 ml |
| Agua | 900 ml |

Ajustar el pH a 7,3 con HCl 1 M; añadir a continuación 0,5 ml de Tween-20.

*Solución amortiguadora de ensayo:*

| | |
|---|---|
| Suero de cabra normal (NGS) | 3,75 ml |
| Solución amortiguadora de lavado | 146,25 ml |

**Recogida de muestras**

Se recoge sangre con un tubo de microhematocrito heparinizado y se coloca en hielo. Tras centrifugar durante 3 minutos, se asigna la puntuación al tubo, que se abre a continuación y el plasma se pasa a tubos de microcentrifugación de 0,6 ml que contienen 0,13 unidades de aprotinina liofilizada. (Estos tubos se preparan con antelación añadiendo la cantidad adecuada de aprotinina, congelándolos y liofilizándolos en vacío a baja temperatura hasta su desecación.) Se conserva el plasma a -80°C hasta que se analice.

**Procedimiento para una placa**

*Recubrimiento de la placa*

Mezclar 20 µl de VTG purificada con 22 ml de solución amortiguadora de carbonato (concentración final de 3 µg/ml). Añadir 200 µl a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tapar la placa con una película de sellado adhesiva y dejar incubando a 37°C durante 2 horas (o a 4°C hasta el día siguiente).

*Bloqueo de la placa*

La solución de bloqueo se prepara añadiendo 2 ml de suero de cabra normal (NGS) a 38 ml de solución amortiguadora de carbonato. Retirar la solución de recubrimiento y sacudir para secar. Añadir a cada pocillo 350 µl de la solución de bloqueo. Tapar la placa con una película de sellado adhesiva y dejar incubando a 37°C durante 2 horas (o a 4°C hasta el día siguiente).

*Preparación de los patrones*

Se mezclan 5,8 µl de patrón de VTG purificada con 1,5 ml de solución amortiguadora de ensayo en un tubo de ensayo desechable de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm. Se obtiene así una concentración de 12760 ng/ml. A continuación se lleva a cabo una serie de diluciones añadiendo 750 µl de la dilución anterior a 750 µl de la solución amortiguadora de ensayo para obtener las concentraciones finales de 12760, 6380, 3190, 1595, 798, 399, 199, 100 y 50 ng/ml.

*Preparación de las muestras*

Empezar con una dilución de plasma en solución amortiguadora de ensayo 1: 300 (por ejemplo, combinar 1 µl de plasma con 299 µl de solucion amortiguadora de ensayo) o 1: 30. Si se espera una cantidad importante de VTG, puede ser necesario utilizar diluciones adicionales o mayores. Ha de procurarse mantener $B/B_o$ en el intervalo de los patrones. Para las muestras sin VTG apreciable como, p. ej., machos y hembras testigo (todos los cuales son inmaduros), se debe utilizar la dilución 1: 30. Las muestras con una dilución menor que esta pueden mostrar efectos matriciales no deseados.

Además, se recomienda estudiar una muestra de un testigo positivo en cada placa. Esta muestra procede de una mezcla de plasma que contiene altos niveles inducidos de VTG. La mezcla se diluye inicialmente en NGS, se divide en partes alícuotas y se conserva a -80°C. Por cada placa, una parte alícuota se descongela, se diluye más en solución amortiguadora de ensayo y se somete a ensayo de forma similar a una muestra problema.

▼**M8**

*Incubación con el primer anticuerpo*

El primer Ab se prepara haciendo una dilución de 1: 2000 del suero con el primer Ab preadsorbido en solución amortiguadora de ensayo (p. ej., 8 µl en 16 ml de solución amortiguadora de ensayo). Se combinan 300 µl de la solución del primer Ab con 300 µl de muestra/patrón en un tubo de vidrio. El tubo $B_o$ se prepara de forma similar con 300 µl de solución amortiguadora de ensayo y 300 µl de anticuerpo. También debe prepararse un tubo de NSB utilizando solo 600 µl de solución amortiguadora de ensayo, es decir, sin Ab. Se cubren los tubos con Parafilm y se agitan suavemente en vórtex para mezclar. Se incuban en un baño de agua a 37ºC durante 1 hora.

*Lavado de la placa*

Justo antes de que se complete la incubación del primer Ab, se lava la placa. Esto se lleva a cabo sacudiendo la placa para expulsar su contenido y secando con papel absorbente. A continuación, se llenan los pocillos con 350 µl de solución de lavado, que se retira después, y se seca con papel absorbente. En este contexto es útil contar con un lavador de placas o una pipeta de repetición multicanal. La fase de lavado se repite dos veces más para efectuar un total de tres lavados.

*Carga de la placa*

Después de haber lavado la placa, se retiran los tubos del baño de agua y se agitan en vórtex ligeramente. Se añaden 200 µl de cada muestra, patrón, $B_o$, y del tubo de NSB, a dos pocillos de la placa. Se tapa la placa con una película de sellado adhesiva y se deja incubando a 37ºC durante 1 hora.

*Incubación con el segundo anticuerpo*

Al final de la incubación de la etapa anterior, la placa debe lavarse tres veces de nuevo, como se indica más arriba. El segundo Ab diluido se prepara mezclando 2,5 µl del segundo Ab con 50 ml de solución amortiguadora de ensayo. Se añaden 200 µl del segundo Ab diluido a cada pocillo, se sella como se indica más arriba, y se incuba durante 1 hora a 37ºC.

*Adición de sustrato*

Una vez finalizada la incubación con el segundo Ab, se lava la placa tres veces como se ha descrito anteriormente. Se añaden a continuación a cada pocillo 100 µl de sustrato de TMB. Se dejan pasar 10 minutos para que se realice la reacción, preferiblemente protegida de la luz intensa. Se interrumpe la reacción añadiendo 100 µl de ácido fosfórico 1 M. De esta manera cambiará el color de azul a amarillo intenso. Se mide la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas.

*Cálculo de B/Bo*

Se resta el valor medio de NSB de todas las mediciones. El valor de B/ $B_o$ correspondiente a cada muestra y patrón se calcula dividiendo el valor de la absorbancia (B) por la absorbancia media de la muestra $B_o$.

*Obtención de la curva patrón y determinación de las cantidades desconocidas*

Se genera una curva patrón con ayuda de algún programa informático de trazado de gráficas (por ejemplo, Slidewrite™ o Sigma Plot®) que extrapole las cantidades a partir del valor de $B/B_o$ de las muestras sobre la base del valor de $B/B_o$ de los patrones. Normalmente, la cantidad se representa a escala logarítmica y la curva tiene forma sigmoidea. Sin embargo, puede tener aspecto lineal si se utiliza un intervalo limitado de patrones. Se corrigen las cantidades de las muestras para tener en cuenta el factor de dilución y se consignan como mg de VTG/ml de plasma.

*Determinación de los límites mínimos de detección (LMD)*

A menudo, especialmente en relación con machos normales, no está claro cómo consignar los resultados de los valores bajos. En estos casos, deben utilizarse los «límites de confianza» del 95 % para determinar si el valor debe consignarse como cero o como algún otro número. Si el resultado de la muestra se encuentra

▼M8

dentro del intervalo de confianza del patrón cero ($B_o$), el resultado debe consignarse como cero. El nivel mínimo de detección será el del patrón más bajo que sea sistemáticamente diferente del del patrón cero; es decir, los dos intervalos de confianza no se han de solapar. Para cualquier resultado de una muestra que esté dentro del límite de confianza del nivel mínimo de detección, o por encima, se consignará el valor calculado. Si una muestra se sitúa entre el intervalo de confianza del patrón cero y el del nivel mínimo de detección, se consignará la mitad del nivel mínimo de detección como valor de dicha muestra.

**BIBLIOGRAFÍA**

Olmstead AW, Korte JJ, Woodis KK, Bennett BA, Ostazeski S, Degitz SJ. 2009. Reproductive maturation of the tropical clawed frog: *Xenopus tropicalis*. General and Comparative Endocrinology 160: 117-123.

Parks LG, Cheek AO, Denslow ND, Heppell SA, McLachlan JA, LeBlanc GA, Sullivan CV. 1999. Fathead minnow (*Pimephales promelas*) vitellogenin: purification, characterisation and quantitative immunoassay for the detection of estrogenic compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 123: 113-125.

▼M8

*Apéndice 7*

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El LAGDA genera tres tipos de datos que se han de analizar estadísticamente: 1) datos cuantitativos continuos, 2) datos de tiempo hasta un evento en cuanto a las tasas de desarrollo (tiempo hasta la fase NF 62) y 3) datos ordinales en forma de puntuaciones de gravedad o fases de desarrollo a partir de las evaluaciones de histopatología. En la figura 1 se muestra el árbol de decisiones de análisis estadísticos recomendado para el LAGDA. Asimismo, a continuación se indican algunas notas que podrían ser necesarias para realizar un análisis estadístico de las mediciones del LAGDA. Respecto al árbol de decisiones de análisis, los resultados de las mediciones de la mortalidad, el crecimiento (peso y longitud) y el índice hepatosomático (IHS) deben analizarse con arreglo a la rama «Otros parámetros».

**Datos continuos**

En primer lugar, debe comprobarse la monotonicidad de los datos de los parámetros continuos, mediante la transformación por rangos de los datos, el ajuste a un modelo de ANOVA y la comparación de contrastes lineales y cuadráticos. Si los datos son monótonos, debe realizarse una prueba de tendencia de ajuste secuencial de Jonckheere-Terpstra con las medianas de las réplicas y no deben aplicarse análisis posteriores. Una alternativa para los datos que se distribuyen normalmente con varianzas homogéneas es la prueba de ajuste secuencial de Williams. Si los datos no son monótonos (el contraste cuadrático es significativo y el lineal no lo es), deben analizarse utilizando un modelo de ANOVA de efectos mixtos. A continuación se deben evaluar los datos en cuanto a su normalidad (utilizando preferentemente la prueba de Shapiro-Wilk o Anderson-Darling) y a la homogeneidad de la varianza (preferentemente con la prueba de Levene). Ambas pruebas se realizan con los valores residuales del modelo de ANOVA de efectos mixtos. Se pueden utilizar juicios de expertos en lugar de estas pruebas formales para determinar la normalidad y la homogeneidad de la varianza, aunque se prefieren las pruebas formales. Si los datos se distribuyen normalmente con varianza homogénea, se cumplen las hipótesis de un ANOVA de efectos mixtos y se determina un efecto significativo del tratamiento a partir de la prueba de Dunnett. En caso de que se compruebe la ausencia de normalidad o la heterogeneidad de la varianza, se infringen las hipótesis de la prueba de Dunnett y se busca una transformación de normalización y de estabilización de la varianza. Si no se encuentra tal transformación, se determinará un efecto del tratamiento significativo con una prueba de Dunn. Siempre que sea posible, debe realizarse una prueba unilateral, a diferencia de una prueba bilateral, pero requiere que un juicio de expertos determine cuál es la apropiada para un parámetro dado.

*Mortalidad*

Deben analizarse los datos de mortalidad en relación con el período que abarque todo el ensayo y expresarse como proporción de animales muertos en un recipiente concreto. Los renacuajos que no completen la metamorfosis en el tiempo establecido, los renacuajos contenidos en la cohorte de la submuestra de larvas, las ranas juveniles objeto de sacrificio parcial y los eventuales animales que mueran por error del experimentador deben tratarse como datos censurados y no incluirse en el denominador del cálculo del porcentaje. Con anterioridad a cualquier análisis estadístico, las proporciones de mortalidad deben ser objeto de una transformación arcoseno de raíz cuadrada. Una alternativa es utilizar la prueba de ajuste secuencial de Cochran-Armitage, posiblemente con un ajuste de Rao-Scott si hay dispersión excesiva.

*Peso y longitud (datos de crecimiento)*

Los machos y las hembras no son sexualmente dimorfos durante la metamorfosis, por lo que los datos sobre el crecimiento de la submuestra de larvas se deben analizar con independencia del sexo. No obstante, los datos relativos al crecimiento de los juveniles deben analizarse por separado en función del sexo genético. Puede ser necesario llevar a cabo una transformación logarítmica en relación con estos parámetros, ya que no es infrecuente la distribución logarítmica normal de los datos sobre el tamaño.

▼M8

*Índice hepatosomático (IHS)*

El peso del hígado debe normalizarse como proporción del peso corporal entero (es decir, IHS) y analizarse por separado en función del sexo genético.

***Tiempo hasta la fase NF 62***

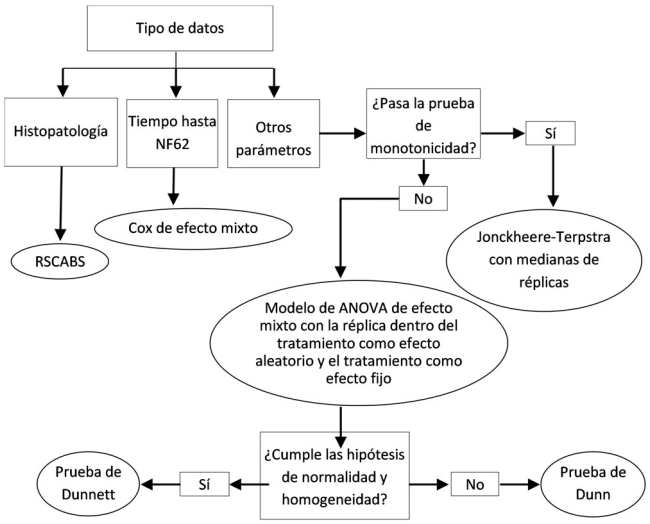
Los datos sobre el tiempo hasta la metamorfosis deben tratarse como datos de tiempo hasta un evento, y los eventuales datos sobre mortalidad o individuos que no alcanzan la fase NF 62 en 70 días se tratan como datos censurados por la derecha (es decir, el valor real es superior a 70 días, pero el estudio finaliza antes de que los animales hayan alcanzado la fase NF 62 en 70 días). La mediana del tiempo hasta la fase NF 62 de finalización de la metamorfosis en los testigos del agua de dilución debe utilizarse para determinar la fecha de terminación del ensayo. La mediana del tiempo hasta la finalización de la metamorfosis podría determinarse mediante los estimadores de producto límite de Kaplan-Meier. Este parámetro debe analizarse utilizando un modelo de peligro proporcional de Cox de efecto mixto que tenga en cuenta la estructura de réplicas del estudio.

***Datos de histopatología (puntuaciones de la gravedad y fases de desarrollo)***

Los datos de histopatología tienen forma de puntuaciones de la gravedad o de fases de desarrollo. Un ensayo denominado RSCABS (*Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices*, modificación de Rao-Scott de la prueba de Cochran-Armitage por cortes) utiliza una prueba de tendencia de Cochran-Armitage con un ajuste de Rao-Scott a cada nivel de gravedad en una respuesta de histopatología (Green *et al.*, 2014). El ajuste de Rao-Scott incorpora al ensayo el diseño experimental de los recipientes replicados. El procedimiento «por cortes» incorpora las expectativas biológicas de que la gravedad del efecto tiende a aumentar con el aumento de las dosis o las concentraciones, manteniendo al mismo tiempo las puntuaciones individuales y revelando la gravedad de los posibles efectos observados. El procedimiento RSCABS no solo determina qué tratamientos son estadísticamente diferentes de los testigos (es decir, tienen una histopatología más grave que los testigos), sino que también determina con qué puntuación de la gravedad se produce la diferencia, proporcionando así un contexto muy necesario para el análisis. En el caso de la determinación de las fases de desarrollo de las gónadas y los conductos genitales, debe aplicarse una manipulación adicional a los datos, ya que la hipótesis de la RSCABS consiste en que la gravedad del efecto aumenta con la dosis. El efecto observado podría ser un retraso o una aceleración del desarrollo. Por lo tanto, los datos sobre las fases de desarrollo deben analizarse tal como se hayan consignado a fin de detectar una eventual aceleración en el desarrollo y, a continuación, deben invertirse manualmente antes de un segundo análisis para detectar un eventual retraso en el desarrollo.

*Figura 1*

**Árbol de decisiones de análisis estadísticos para los datos del LAGDA**



▼**M8**

**BIBLIOGRAFÍA**

Green JW, Springer TA, Saulnier AN, Swintek J. 2014. Statistical analysis of histopathology endpoints. Environmental Toxicology and Chemistry 33, 1108-1116.

▼M8

*Apéndice 8*

CONSIDERACIONES SOBRE EL SEGUIMIENTO Y LA REDUCCIÓN AL MÍNIMO DE LA INCIDENCIA DE LA ESCOLIOSIS

La escoliosis idiopática, generalmente manifestada como cola torcida en los renacuajos de *Xenopus laevis*, puede complicar las observaciones morfológicas y comportamentales de las poblaciones sometidas a ensayo. Debe intentarse minimizar o eliminar la incidencia de la escoliosis, tanto en las poblaciones iniciales como en las condiciones de ensayo. En el ensayo definitivo, se recomienda que la prevalencia de la escoliosis moderada y grave sea inferior al 10 %, con el fin de aumentar la confianza en que el ensayo pueda detectar efectos sobre el desarrollo relacionados con el tratamiento en larvas de anfibios que por lo demás estén sanas.

Las observaciones diarias durante el ensayo definitivo deben registrar tanto la incidencia (recuento de animales) como la gravedad de la escoliosis, cuando se dé esta. La naturaleza de la anomalía debe describirse con respecto a la ubicación (p. ej., anterior o posterior a la cloaca) y a la dirección de la curvatura (p. ej., lateral o dorsal a ventral). La gravedad puede clasificarse del siguiente modo:

(NR) No relevante: no se observa ninguna curvatura;

(1) Mínima: ligera curvatura lateral, posterior a la cloaca; visible solo en reposo;

(2) Moderada: curvatura lateral, posterior a la cloaca; es visible en todo momento pero no inhibe el movimiento;

(3) Grave: curvatura lateral, anterior a la cloaca; O cualquier curvatura que inhiba el movimiento; O cualquier curvatura dorsal a ventral.

Un Grupo Consultivo Científico (SAP, *Scientific Advisory Panel*) de la FIFRA de la EPA de EE.UU. (FIFRA SAP 2013) revisó los datos resumidos relativos a la escolosis en quince ensayos de metamorfosis de anfibios con *X. laevis* (fase NF de 51 a 60+) y ofreció recomendaciones generales para reducir la prevalencia de esta anomalía en las poblaciones sometidas a ensayo. Las recomendaciones son pertinentes para el LAGDA, aunque este ensayo abarca un tiempo de desarrollo más largo.

**Comportamiento histórico en cuanto al desove**

Por lo general, deben usarse como parejas reproductoras adultos de alta calidad y sanos; la eliminación de las parejas de cría que producen descendientes con escoliosis puede reducir al mínimo su incidencia a lo largo del tiempo. En concreto, puede ser beneficiosa la minimización del uso de animales reproductores capturados en el medio silvestre. El período de exposición del LAGDA comienza con embriones en la fase NF 8-10, y no es factible determinar al principio del ensayo si los individuos concretos van a presentar escoliosis. Así pues, además de hacer un seguimiento de la incidencia de la escoliosis en los animales que se someten al ensayo, debe documentarse el comportamiento histórico de la nidada de animales (incluida la prevalencia de la escoliosis en las larvas a las que se permita desarrollarse). Puede ser útil seguir realizando un seguimiento de la parte de cada nidada que no se utilice en un determinado estudio y consignar estas observaciones (FIFRA SAP 2013).

**Calidad del agua**

Es importante garantizar una calidad adecuada del agua, tanto en relación con la población de laboratorio como durante el ensayo. Además de los criterios de calidad del agua que se evalúan sistemáticamente en los ensayos de toxicidad acuática, puede ser útil supervisar y corregir las eventuales deficiencias de nutrientes (como, por ejemplo, deficiencia de vitamina C, calcio, fósforo) o los niveles excesivos de selenio y cobre, de los que se dice que provocan escoliosis en diversos grados en especímenes de *Rana* sp. y *Xenopus* sp. criados en laboratorio (Marshall *et al.,* 1980; Leibovitz *et al.,* 1992; Martínez *et al.,* 1992; tal y como se recoge en FIFRA SAP 2013). En general, el uso de un régimen alimentario adecuado (véase el apéndice 4) y la limpieza periódica de los recipientes mejoran la calidad del agua y la salud de los ejemplares sometidos al ensayo.

▼**M8**

**Alimentación**

En el apéndice 4 se detallan las recomendaciones específicas sobre el régimen alimentario, de las que se ha comprobado que tienen éxito en el LAGDA. Se recomienda que se controlen las fuentes de alimentación en cuanto a la presencia de toxinas biológicas, herbicidas y otros plaguicidas de los que se sepa que causan escoliosis en *X. laevis* o en otros animales acuáticos (Schlenk y Jenkins, 2013). Por ejemplo, la exposición a determinados inhibidores de la colinesterasa se ha asociado con la escoliosis en peces (Schultz *et al.,* 1985) y ranas (Bacchetta *et al.,* 2008).

**BIBLIOGRAFÍA**

Bacchetta, R., P. Mantecca, M. Andrioletti, C. Vismara, and G. Vailati. 2008. Axial-skeletal defects caused by carbaryl in *Xenopus laevis* embryos. Science of the Total Environment 392: 110 – 118.

Schultz, T.W., J.N. Dumont, and R.G. Epler. 1985. The embryotoxic and osteolathyrogenic effects of semicarbazide. Toxicology 36: 185-198.

Leibovitz, H.E., D.D. Culley, and J.P. Geaghan. 1982. Effects of vitamin C and sodium benzoate on survival, growth and skeletal deformities of intensively culture bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*) reared at two pH levels. Journal of the World Aquaculture Society 13: 322-328.

Marshall, G.A., R.L. Amborski, and D.D. Culley. 1980. Calcium and pH requirements in the culture of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae. Journal of the World Aquaculture Society 11: 445-453.

Martínez, I., R. Álvarez, I. Herráez, and P. Herráez. 1992. Skeletal malformations in hatchery reared *Rana perezi* tadpoles. Anatomical Records 233(2): 314-320.

Schlenk, D., and Jenkins, F. 2013. Endocrine Disruptor Screening Prog (EDSP) Tier 1 Screening Assays and Battery Performance. US EPA FIFRA SAP Minutes No. 2013-03. May 21-23, 2013. Washington, DC.